

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas Programa de Pós-graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas

A PROTEÍNA P21 DE *Trypanosoma cruzi* DAS CEPAS G E Y
APRESENTA ATIVIDADE PLEIOTRÓPICA NA INVASÃO,
MULTIPLICAÇÃO CELULAR, ECLOSÃO *in vitro* E NO
PARASITISMO TECIDUAL *in vivo*

Nelsa Paula Inácio Uombe

Uberlândia
Janeiro, 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas Programa de Pós-graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas

A PROTEÍNA P21 DE *Trypanosoma cruzi* DAS CEPAS G E Y
APRESENTA ATIVIDADE PLEIOTRÓPICA NA INVASÃO,
MULTIPLICAÇÃO CELULAR, ECLOSÃO *in vitro* E NO
PARASITISMO TECIDUAL *in vivo*

Dissertação de mestrado submetida ao colegiado
do Programa de Pós-graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial
à obtenção do título de mestre

Discente: Nelsa Paula Inácio Uombe
Orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva
Coorientadora: Dra. Bruna Cristina Borges
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva

Uberlândia
Janeiro, 2024

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

U64p
2024

Uombe, Nelsa Paula Inácio, 1988-

A proteína P21 de *Trypanosoma cruzi* das cepas G e Y apresenta atividade pleiotrópica na invasão, multiplicação celular, eclosão *in vitro* e no parasitismo tecidual *in vivo* [recurso eletrônico] / Nelsa Paula Inácio Uombe. - 2024.

Orientador: Claudio Vieira da Silva.

Coorientadora: Bruna Cristina Borges.

Coorientador: Marcelo José Barbosa Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.8121>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Parasitologia. I. Silva, Claudio Vieira da, 1972-, (Orient.). II. Borges, Bruna Cristina, 1990-, (Orient.). III. Silva, Marcelo José Barbosa, 1976-, (Coorient.). IV. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. V. Título.

CDU: 576.8

André Carlos Francisco
Bibliotecário - CRB-6/3408



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico nº 292 do PPGIPA				
Data:	19/02/2024	Hora de início:	14h00	Hora de encerramento:	16h55min
Matrícula do Discente:	12212IPA001				
Nome do Discente:	Nelsa Paula Inácio Uombe				
Título do Trabalho:	A PROTEÍNA P21 DE Trypanosoma cruzi DAS CEPAS G E Y APRESENTA ATIVIDADE PLEIOTRÓPICA NA INVASÃO, MULTIPLICAÇÃO CELULAR, ECLOSÃO in vitro E NO PARASITISMO TECIDUAL in vivo				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das Interações entre patógenos e seus hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Rede de pesquisa em doenças infecciosas humanas e animais no estado de Minas Gerais				

Reuniu-se, em 19/02/2024 às 14h00, pela plataforma Microsoft Teams, a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos titulares: Dra. Simone Guedes Calderano - Instituto Butantan (Pesquisadora); Profa. Dra. Neide Maria Silva - ICBIM/UFU; Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva - ICBIM/UFU (Presidente), orientador(a) do(a) candidato(a).

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

A seguir, o 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):

APROVADA

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

Uberlândia, 19 de fevereiro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Vieira da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/02/2024, às 16:56, 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 **Neide Maria da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/02/2024, às 16:57, 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 **Simone Guedes Calderano, Usuário Externo**, em 19/02/2024, às 16:57, 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, informando o código verificador **5182687** e o código CRC **82D9784D**.

Referência: Processo nº 23117.011200/2024-61

SEI nº 5182687

Dedico este trabalho em memória a minha adorada mãe
Beatriz Feleciana Cucu, uma mulher forte e perseverante.

Cada momento da vida é uma nova chance rumo a um recomeço, mas, ninguém prevê o percurso do recomeço somente decide o final do recomeço. Por isso, continue sempre em busca de novos recomeços.

Nelsa Uombe

AGRADECIMENTOS

O meu muito obrigado vai ao Professor Claudio Vieira da Silva por ter me aceite como sua estudante e pela oportunidade de aprendizagem por ele concedida, pela paciência, amizade, compreensão.

Agradeço imensamente a Dra. Bruna Cristina Borges pelos seus sábios ensinamentos, amabilidade, amizade e paciência e ao Professor Marcelo José Barbosa Silva pelos ensinamentos, paciência e compreensão. Meu muito obrigado é endereçado também a magnífica equipa do laboratório de tripanossomatídeos (LATRI) ICBIM-UFU, em especial a Anna Clara Silveira, Teresiana Velikkakam, Cecília da Luz, Elida Monteiro, Cassiano Rodrigues pela disponibilidade, paciência, tolerância, amor e ensinamentos transmitidos.

Agradeço também ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicada e a Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pela chance de poder mergulhar mais no conhecimento científico. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Grupo de Cooperação Internacional de Universidade Brasileiras (GCUB) em particular ao Programa de Formação de Professores do Educação Superior de Países Africanos (Pro-afri) pela oportunidade concedida para a formação superior, vai o meu muito obrigado pelo apoio financeiro. Ao meu país de origem, Moçambique, em particular ao Ministério da Ciência e Tecnologia, Ensino Superior e Técnico Profissional de Moçambique (MCTESTP) e a Universidade Eduardo Mondlane-Escola Superior de Desenvolvimento Rural em Vilanculos (UEM-ESUDER), agradeço imensamente pela oportunidade concedida em continuar a formação superior e ainda pelo apoio financeiro concedido.

Ao Laboratório de Microbiologia Molecular, Laboratório de Imunoparasitologia Dr. Mário Endsfieldz Camargo, Laboratório de Morfologia e Laboratório de Biologia de Reprodução do ICBIM-UFU, Laboratório de biologia celular e molecular de Tripanossomídeos do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bio agentes Patogênicos da Faculdade de Medicina na Universidade de Ribeirão Preto, ao pessoal da Rede de Biotérios e Roedores-UFU, meu muito obrigado pela atenção e disponibilidade dispensada.

O meu obrigado especial vai ao meu marido João Baptista Garrancho por acreditar em mim, deixar-me seguir os meus sonhos, pelo suporte incondicional e ainda pela dedicação a família.

Endereço o meu obrigado especial também aos meus amados e queridos filhos Míchel Monteiro Garrancho e Daniela Monteiro Garrancho por serem fortes e por darem-me mais coragem. Agradeço também aos meus queridos irmãos, Hernâni, Natália, Leonel, Cremilda, Celmiro e Inês pelos incentivos, paciência, amor e por sempre estarem presente nesta árdua jornada. E ainda endereço agradecimento especial a Sissi Kelly pela maravilhosa pessoa que ela é, sem me esquecer dos meus compatriotas residentes no Brasil, companheiros desta jornada árdua. A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desta dissertação de mestrado, o meu muito obrigado.

Aos meus pais, agradeço amorosamente por terem me concedido a oportunidade de estar neste mundo, pelo esforço e dedicação em educar-me e ao meu pai por ter me tornado uma pessoa valente.

Endereço o meu primeiro e último agradecimento profundo e especial à Deus por ter me concedido o dom da vida e tê-la guardado e guiado.

Muito obrigada!!!

LISTAS DE ABREVIACÕES

%- percentagem
°C-graus Celsius
µg/mL- micrograma por mililitros
µg-microgramas
µL- microlitros
µm-micrometros
3'UTR - região 3' não traduzida
a.C- antes de Cristo
ACTH-hormônio adenocorticotrópico
AE/EA - amastigotas extracelulares
ANOVA- análise de variância
ASM- esfingomielinase Ácida
ATP-adenosina trifosfato
bp-pares de base
BSA - Albumina Sérica Bovina
Bsd- blasticidina
bz-Benzimidazol
C57BL/6 INF γ ^{-/-}- camundongos da linhagem C57BL/6 nocaute ao interferon gamma
CCC - cardiomiopatia chagásica crônica
cDNA- DNA cinetoplasto
CEUA-Comité de Ética para o Uso de Animais
CHAPS - 3-[3-colamidopropil dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CME-endocitose mediada por clatrina
CO₂- dióxido de carbono
CRISPR/Cas9- Clustered regularly interspaced short palindromic repeat- associated protein Cas9
Cu/Zn-SOD- superóxido dismutase de cobre/zinco
CYP51-esterol 14 α -desmetilase
Dag – Diacilglicerol
DAPI-4, 6-diamidino-2-phenylindole
DC-doença de Chagas
DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium/high glucose
DNA Ácido desoxirribonucleico
DTN- Doença tropical negligenciada
DTT – ditioneitol
DTU- Discrete Typing Units (unidade discreta de tipagem)
E.P- erro padrão (SEM do inglês)
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
EMCs-componentes da matriz extracelular
EMCs-componentes da matriz extracelular
Fe-SOD- superóxido dismutase de ferro

fg-Fentogramas
G418- antibiótico Geneticina
 γ -HCH-gamma- hexaclorociclo-hexano
GIPs -glicoinositolfosfolipídios
gp35/50-glicoproteínas 35/50
gp82-glicoproteínas 82
gp90-glicoproteínas 90
GPIs- glicosilfosfatidilinositol
HE-hematoxilina e eosina
h-horas
IFN- γ -interferon gamma
IL-10- interleucina 10
IL-12- interleucina 12
IL-4- interleucina 4
INCOSUR - iniciativa do Cone Sul
INF $\gamma^{-/-}$ -nocaute ao interferon gamma
IPG - gradiente de pH imobilizado
kDa – Kilodáltons
kDNA - DNA do cinetoplasto
km- quilômetros
KO- Nocaute (knockout)
LAMP-1- a proteína 2 da membrana associada ao lisossoma
LAMP-2-a proteína 2 da membrana associada ao lisossoma
LIT - Liver Infusion Triptose
MHC- Complexo principal de histocompatibilidade
min- minutos
MLGs - micos-leões-dourados
Mn-SOD- superóxido dismutase de manganês
MOI- multiplicidade de infecção
MP-membrana plasmática
NaCl- cloreto de sódio
NADPH- forma reduzida do fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
ng- nanogramas
Nif -Nifurtimox
Ni-SOD- superóxido dismutase de níquel
NTDs-doenças tropicais negligenciadas
OMS (WHO) - Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)
OPAS/ PAHO - Organização Pan-Americana da Saúde
P21- proteína de 21kDa
P3,4P2-Fosfatidilinositol 3-Fosfato PI3P/ Fosfatidilinositol 3,4-bifosfato
PAMP-padrão molecular associado a patógenos
PBS - tampão salina fosfato
PCR – Polymerase chain reaction

PFA- paraformaldeído
 pH - Potencial de hidrogênio
 PI3-quinases de classe I,
 PI-PLC-fosfolipase C endógena específica do fosfatidilinositol
 PK- proteínase K
 PRRs -receptores de reconhecimento de padrão
 qPCR- PCR quantitativo
 Rab5-rabankirina 5
 rDNA-DNA ribossômico
 RIBER- Rede de Biotérios e Roedores
 RNA - ácido ribonucléico
 RNAm/mRNA – RNA mensageiro
 rP21- P21 recombinante
 rpm- rotações por minuto
 rRNA/RNAr - RNA ribossomal
 RT-PCR- PCR em tempo real
 s- Segundos
 SAP-serine-, alanine-, and proline-rich protein
 SBF - soro bovino fetal
 SDS - sulfato de dodecil de sódio
 SODs-superóxidos dismutase
 Ssp-4-proteína de superfície específica 4
 Ssp-4-proteína de superfície específica 4
 SytVII- isoforma VII da sinaptotagmina
 T(SH)2-tripantonina
T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*
T. cruzi II – *Trypanosoma cruzi* II
T. cruzi I – *Trypanosoma cruzi* I
 TcHGPRT- *T. cruzi* mevalonate kinase
 TcMVK- *T. cruzi* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
 TcMVK-mevalonato quinase
 TcMVK-mevalonato quinase de *Trypanosoma cruzi*
 TcP21^{-/-}- parasitas nocaute no gene da P21 de *Trypanosoma cruzi*
 TcPLA1-fosfolipase A1 associada à membrana
 TCRs- complexo de receptores de células T
 TcSM -*Trypanosoma cruzi* Surface Membrane Proteins
 TCT- tripomastigotas de cultura em tecidos
 TLR2-Receptor Toll-Like 2
 TLRs - receptores tipo Toll
 TM/MT- Tripomastigotas metacíclicos
 TNF- α - Fatores de Necrose Tumoral Alfa
 TOS- Transplante de órgãos sólidos (sigla em inglês STO, Solid organ transplantation)
 Tris - tris-(hidroximetil)-amino metano

TS2- dissulfeto de tripanotona

U/ml-Unidade por mililitro

USD\$-dolares americanos

VAMP3-proteínas de membrana associadas à vesícula 3

VAMP7- proteínas de membrana associadas à vesícula 7

VP – Vacúolo parasitóforo, tradução nossa (sigla em inglês PV, parasitoforo vacuolo)

WT-Wild Type (Linhagem selvagem)

Z1 - Zimodema 1

Z2 - Zimodema 2

Z3 – Zimodema 3

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Linha cronológica da descoberta da doença de Chagas.....	8
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> e principais desafios para o desenvolvimento de tratamentos eficazes para a doença de Chagas.....	18
Figura 3. Distribuição das DTUs de <i>T. cruzi</i> nas Américas.....	24
Figura 4. Distribuição das DTUs de <i>Trypanosoma cruzi</i> nos biomas Brasileiros segundo os isolados depositados na Coleção de <i>Trypanosoma</i> de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores e as infecções mistas observadas e seus hospedeiro.....	25
Figura 5. Modelo de invasão de <i>T. cruzi</i>	49
Figura 6. Modelo esquemático de interação de <i>T. cruzi</i> com as proteínas da célula hospedeira e ativação de vias de sinalização durante a invasão.....	56
Figura 7. Invasão celular de parasitas da cepa G de <i>T. cruzi</i> TcP21 ^{-/-} e parentais na linhagem celular Vero e C2C12.....	70
Figura 8. Multiplicação intracelular de parasitas da cepa G de <i>T. cruzi</i> TcP21 ^{-/-} e parentais na linhagem celular Vero (A e C) e C2C12 (B e D).....	71
Figura 9. Invasão celular de parasitas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> TcP21 ^{-/-} e parentais na linhagem celular Vero e C2C12.....	72
Figura 10. Multiplicação intracelular da cepa Y de <i>T. cruzi</i> TcP21 ^{-/-} e parentais na linhagem celular Vero e C2C12.....	73
Figura 11. Carga parasitária por qPCR na cinética do tempo de experimentos <i>in vitro</i> nas linhagens celular Vero e C2C12 infectada com parasitas da cepa G.....	74
Figura 12. Carga parasitária por qPCR na cinética do tempo de experimentos <i>in vitro</i> nas linhagens celular C2C12 infectada com parasitas da cepa Y..	75
Figura 13. Eclosão de tripomastigotas e amastigotas em células Vero e C2C12 infectadas com parasitas da cepa G ao longo da cinética de tempo.	76
Figura 14. Eclosão de tripomastigotas e amastigotas em células Vero e C2C12 infectadas com parasitas da cepa G ao longo da cinética de tempo	77
Figura 15. Parasitemia sistêmica de <i>T. cruzi</i> e carga parasitária do tecido cardíaca quantificada por qPCR.	78
Figura 16. Imagens qualitativa de alterações histopatológicas do tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 nocaute para INF γ infectados com <i>T. cruzi</i> da cepa G.....	79
Figura 17. Imagens qualitativa de alterações histopatológicas do tecido cardíaco de camundongos BALB/c infectados com <i>T. cruzi</i> da cepa Y.....	79

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados para confirmação de nocaute a P21 e qPCR.....	64
Tabela 2. Análises qualitativas de tecidos cardíacos de camundongos knockout para INF γ (C57BL/6) aos 15 dias pós-infecção com TCT da cepa G de <i>T. cruzi</i> , corados em HE.....	80
Tabela 3. Análises qualitativas de tecidos cardíacos de camundongos Balb/c aos 15 dias pós-infecção com TCT da cepa Y de <i>T. cruzi</i> , corados em HE.....	81

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ASPECTOS GERAIS SOBRE A DOENÇA DE CHAGAS	1
1.2. HISTÓRIA DA DESCOBERTA DA DOENÇA DE CHAGAS E ORIGEM DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.3. FORMAS DE TRANSMISSÃO DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
1.4. CICLO DE VIDA DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
1.5. CLASSIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS UNIDADES DISCRETAS DE TIPAGEM DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.6. FASES DA INFECÇÃO NATURAL E EXPERIMENTAL	26
1.7. RESPOSTA IMUNOLÓGICA NATURAL E EXPERIMENTAL POR <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
1.8. TRATAMENTO CONTRA A DOENÇA DE CHAGAS E DESAFIOS	35
1.9. INTERAÇÃO DE <i>Trypanosoma cruzi</i> COM HOSPEDEIRO VERTEBRADO	43
1.9.1. Mecanismo de invasão, diferenciação e eclosão de <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
1.9.1.1. Moléculas do hospedeiro envolvidas na interação parasita-hospedeiro	50
1.9.1.2. Moléculas do parasita envolvidas na invasão das formas tripomastigotas metacíclicas (TM)	50
1.9.1.3. Moléculas envolvidas na invasão das formas tripomastigotas de cultura em tecido (TCT).....	52
1.9.1.4. Moléculas envolvidas na invasão das formas amastigotas extracelulares (AE).....	55
1.10. DESCOBERTA E IMPORTÂNCIA DA P21 NO PROCESSO INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	57
2. OBJETIVOS	61
2.1. GERAL	61
2.2. ESPECÍFICOS	61
3. MATERIAS E MÉTODOS	62
3.1. CULTURAS CELULARES E PARASITAS.....	62
3.1.2. Obtenção das formas tripomastigotas de cultura de tecido que não expressam a P21 da cepa G e Y.....	62
3.2. ANIMAIS E ÉTICA.....	62
3.3. CONFIRMAÇÃO DO NOCAUTE POR PCR CONVENCIONAL.....	63
3.4. EXPERIMENTOS DE INVASÃO	64
3.5. MULTIPLICAÇÃO DE AMASTIGOTAS INTRACELULARES POR COLORAÇÃO COM GIEMSA	64
3.6. QUANTIFICAÇÃO DE AMASTIGOTAS INTRACELULARES EM CULTURA CELULAR POR qPCR	65

3.7. EXPERIMENTOS DE ECLOSÃO.....	66
3.8. INFECCÃO EXPERIMENTAL <i>in vivo</i>	66
3.8.1. Quantificação da parasitemia sistêmica em camundongos C57BL/6 $INF\gamma^{-/}$ e BALB/c	67
3.8.2. Quantificação do DNA de <i>T. cruzi</i> no tecido cardíaco por qPCR.....	67
3.8.3. Análise histopatológica do tecido cardíaco em coloração HE	68
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
4. RESULTADOS.....	70
4.1. EXPERIMENTAÇÃO <i>in vitro</i> EM CÉLULA VERO E C2C12	70
4.1.1. Invasão e multiplicação de amastigotas intracelular em célula Vero e C2C12 infectadas com parasitas da cepa G.....	70
4.1.2. Invasão e multiplicação de amastigotas intracelular em célula Vero e C2C12 com a cepa Y.....	72
4.1.3. Determinação da carga parasitária de experimento <i>in vitro</i> por qPCR	74
4.1.4. Taxa de eclosão de tripomastigotas e amastigotas em célula Vero e C2C12 infectadas com parasitas da cepa G.....	75
4.1.5. Taxa de eclosão de tripomastigotas e amastigotas extracelulares em célula Vero e C2C12 infectadas com parasitas da cepa Y.....	76
4.2. EXPERIMENTAÇÃO <i>in vivo</i> COM CAMUNDONGOS C57BL/6 $INF\gamma^{-/}$ E BALB/C	77
4.2.1. Determinação da parasitemia sistêmica e da carga parasitaria no tecido cardíaco por qPCR.....	77
4.2.2. Alterações histopatológicas no tecido cardíaco.....	79
5. DISCUSSÃO	82
6. CONCLUSÕES	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
8. ANEXOS	119

RESUMO

A P21 é uma proteína secretada por todas as formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* com atividade biológica reconhecida. No entanto, ainda não é claro o impacto desta proteína na interação *T. cruzi*-hospedeiro. Em nossos estudos anteriores, realizamos pesquisas com a forma recombinante da P21, onde demonstramos que provavelmente, ela esteja envolvida na invasão e multiplicação celular. Com isso, a fim de avaliar o efeito desta proteína sobre a invasão, multiplicação e eclosão, geramos parasitas que não expressam a P21 da cepa pouco virulenta (cepa G) e da virulenta (cepa Y). Conduzimos experimentos *in vitro* nas linhagens celular Vero e C2C12, infectadas com tripomastigotas derivados de cultura em tecidos (TCT) nocaute à P21 (TcP21^{-/-} da cepa G e da cepa Y) e parasitas parentais de ambas as cepas como controle (expressam a proteína Cas9). Realizamos também experimentos em modelo mais complexos, *in vivo* em camundongos C57BL/6 INF γ ^{-/-} (nocaute ao INF γ) e BALB/c infectados com TCT da cepa G e Y (nocaute a P21 e controle), respetivamente. A invasão e multiplicação (24, 48, 72 e 96 horas) foram determinadas pelo método de coloração com Giemsa e por qPCR determinamos o DNA de *T. cruzi* dos experimentos de multiplicação. Determinamos a eclosão por contagem em microscopia a partir das 72 às 240 horas pós-infecção (hpi). Quanto aos experimentos *in vivo*, após a infecção dos animais, coletamos sangue da veia caudal de três em três dias até ao 15º dias pós-infecção (dpi). Após a eutanásia, coletamos o coração para quantificar o DNA de *T. cruzi* por qPCR e análise histopatológica. Em célula Vero e C2C12, observamos que os parasitas TcP21^{-/-} da cepa G invadiram significativamente menos. Multiplicaram significativamente menos as 96 horas em célula Vero e de maneira similar na célula C2C12. Por outro lado, os parasitas TcP21^{-/-} e parentais da cepa Y invadiram e multiplicaram de forma similar em célula Vero. Em célula C2C12 os parasitas da cepa Y TcP21^{-/-} invadiram significativamente menos a célula hospedeira e na multiplicação apresentaram significativamente menor percentagem de célula invadida as 72 horas. A qPCR realizada em célula Vero infectada com parasitas TcP21^{-/-} da cepa G demonstrou significativamente menor taxa de multiplicação nos tempos de 24, 48 e 96 horas. E na linhagem celular C2C12 infectada com parasitas da cepa G TcP21^{-/-} no tempo de 72 horas observamos significativamente menor quantidade de DNA de *T. cruzi* enquanto na mesma linhagem celular infectada com parasitas da cepa Y TcP21^{-/-} no tempo de 72 horas observamos significativamente maior quantidade de DNA de *T. cruzi*. A eclosão de tripomastigotas (cepa G) em célula Vero foi significativamente menor nos parasitas TcP21^{-/-} em comparação aos controles a partir das 168 hpi e de amastigotas foi significativamente maior às 240 hpi nos parasitas TcP21^{-/-}. Na célula C2C12, infetada com a cepa Y observamos maior eclosão de TCT e amastigotas nos parasitas TcP21^{-/-}, mas foi significativa no tempo de 144 hpi nos TCT. *In vivo*, não observamos parasitemia sistêmica patente nos animais infectados com TCT da cepa G. Quanto aos animais infectados com a cepa Y observamos parasitemia detetável, significativamente maior nos animais infectados com parasitas TcP21^{-/-} do 3º ao 6º dpi. A qPCR do tecido cardíaco, nos animais infectados com a cepa G demonstrou quantidade de DNA de *T. cruzi* significativamente menor nos parasitas TcP21^{-/-}. Na cepa Y observamos quantidade de DNA significativamente maior nos parasitas TcP21^{-/-}. A resposta inflamatória no tecido cardíaco de animais infectados com a cepa G foi baixa/média nos TcP21^{-/-} e parentais. No tecido cardíaco infectado com cepa Y TcP21^{-/-} observamos qualitativamente maior predominância de neutrófilos, macrófagos, corpos apoptóticos e grande número de ninhos de amastigotas. Diante disso, podemos afirmar que a P21, provavelmente seja importante na interação patógeno-hospedeiro durante a invasão, multiplicação celular e eclosão. E que possivelmente faça parte do mecanismo que promove a infecção crônica sem parasitemia sistêmica patente, agindo de forma diferente a depender da célula hospedeira, forma infectiva e da linhagem filogenética do parasita.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; CRISPR/Cas9; interação patógeno-hospedeiro; invasão celular; multiplicação intracelular; virulência

ABSTRACT

P21 is a protein secreted by all forms of *Trypanosoma cruzi* with recognized biological activity. However, the impact of this protein on the cell cycle in this protozoan is still unclear. In our previous studies, we carried out research with the recombinant form of P21, where we demonstrated that it is probably involved in cell invasion and multiplication. Therefore, in order to evaluate the effect of this protein on invasion, multiplication and egress, we generated parasites that do not express (knockout) P21 of the low virulent strain (G strain) and the highly virulent strain (Y strain). Then, we conducted *in vitro* experiments in Vero and C2C12 cells, infected with tissue culture-derived trypomastigotes (TCT) knockout for P21 (TcP21^{-/-} of strain G and strain Y) and parental parasites of both strains as control (express the Cas9 protein). Also performed *in vivo* experiments in C57BL/6 INF γ ^{-/-} (knockout for INF γ) and BALB/c mice infected with TCT G and Y strain, respectively. Invasion and multiplication were performed using the Giemsa staining method, and multiplication was also evaluated by qPCR (24, 48, 72 and 96 hours). Egress was determined by microscopy counting from 72 to 240 hours post-infection. As for *in vivo* experiments, after the animals were infected, we collected blood from the tail vein every three days until the 15th day post-infection (dpi). After euthanasia, the heart was collected to quantify the parasite DNA by qPCR and for histopathological analysis. In Vero and C2C12 cells, we observed that TcP21^{-/-} strain G parasites invaded significantly less. The 96 hours multiplied significantly less in the Vero cell and similarly in the C2C12 cell. On the other hand, TcP21^{-/-} and parental Y strain parasites invaded and multiplied similarly in Vero cells and invaded significantly less in C2C12 cells. qPCR performed on Vero cells infected with TcP21^{-/-} strain G parasites demonstrated a significantly lower multiplication rate at 24, 48 and 96 hours. And in the C2C12 cell line infected with strain G and Y, we observed a significantly lower amount of *T. cruzi* DNA in TcP21^{-/-} parasites after 72 hours. The egress of trypomastigotes (strain G) in Vero cells was significantly lower in TcP21^{-/-} parasites compared to controls from 168 hpi and amastigotes was significantly higher at 240 hpi in TcP21^{-/-} parasites. In the C2C12 cell, infected with strain Y, we observed greater egress of TCT and amastigotes in TcP21^{-/-} parasites, but it was significant at 144 hpi in TCT. *In vivo*, we did not observe patent systemic parasitemia in animals infected with TCT from G strain, as for animals infected with Y strain, we observed patent parasitemia, significantly higher in TcP21^{-/-} parasites from the 3rd to the 6th dpi. The qPCR of heart tissue, in animals infected with G strain, we observed a significantly lower quantity of *T. cruzi* DNA in TcP21^{-/-} parasites. In Y strain, we observed a significantly higher quantity of DNA in TcP21^{-/-} parasites. The inflammatory response in the heart tissue of animals infected with the G strain was low/medium in TcP21^{-/-} and parental parasites. While in the cardiac tissue infected with Y strain TcP21^{-/-}, we qualitatively observed a higher predominance of neutrophils, macrophages, apoptotic bodies and a large number of amastigote nests. Therewith, we assume that P21 is probably important in the pathogen-host interaction during invasion, cell multiplication and egress. Probably be part of the mechanism that promotes chronic infection without patent systemic parasitemia and acting differently depending on the cell line host and parasite phylogenetic lineage.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; CRISPR/Cas9; parasite-host interaction; cell invasion; intracellular multiplication; virulence

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS SOBRE A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (DC) também conhecida como Tripanossomíase Americana, doença de Romanã ou Chagas-Mazza é classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das 20 doenças tropicais negligenciadas (DTN). Ela é causada por um parasita hemoflagelado pertencente ao filo *Sarcomastigophora*, ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, designado *Trypanosoma cruzi* (Lidani *et al.*, 2019; Martín-escolano *et al.*, 2022; WHO, 2023). *T. cruzi* é transmitido por insetos vectores da subfamília *Triatominae* (filo: *Arthropoda*, subfilo: *Hexapoda*, ordem: *Hemiptera*, família: *Reduviidae*) (Rassi *et al.*, 2012) através do ciclo silvestre ou doméstico. Atualmente são descritas outras formas de transmissão da doença, via oral, congênita, transfusão de sangue em regiões onde a enfermidade é endêmica e não endêmica (De Lana & de Menezes Machado, 2017; Dye-Braumuller *et al.*, 2021).

As subpopulações de *T. cruzi*, de acordo com a nomenclatura atual são agrupadas em seis linhagens ou unidades discretas de tipagem (DTUs), de TcI à TcVI e uma sétima TcBat. As linhagens TcI e TcII são as mais distantes genética e filogeneticamente (Jansen *et al.*, 2020). A DC é endêmica na América Latina, onde são observadas altas taxas de prevalência primeiramente no norte da Argentina, seguido pelo Brasil, Bolívia, México e Colômbia (Gorla *et al.*, 2017; Dye-Braumuller *et al.*, 2021; Shikanai Yasuda, 2021). Em termos da taxa de incidência, o Brasil ocupa a terceira posição com aproximadamente 1,2 milhões de casos e 6.000 mortes por ano relatados nas últimas décadas (Martins-Melo *et al.* 2011). Atualmente, devido a migração, a DC tem se alastrado para outras regiões do globo terrestre (não endêmicas) tais como o Norte da América, Europa, Austrália, Ásia e alguns países Africanos (WHO, 2023; Dye-Braumuller *et al.*, 2021). Estima-se que a enfermidade causa perdas econômicas em torno de 1-2 bilhões de USD\$ por ano, sendo esses custos relacionados aos gastos envolvidos na terapia da doença (De Lana & De Menezes Machado, 2017; Martín-Escolano *et al.*, 2022).

A DC apresenta duas fases: aguda e crônica sendo que a última pode ser sintomática ou assintomática, e é responsável pela morbidade e mortalidade significativa causada pelo protozoário, chegando a levar custos econômicos globais em torno de 627,5 milhões de USD\$ por ano em tratamento. Supõe-se que na fase aguda os custos por paciente estejam em torno de 200 USD\$ e na fase crônica de 4000-6000 USD\$ (Lidani *et al.*, 2019).

Dados atuais indicam que cerca de 6-8 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas em regiões endêmicas e cerca de 75 milhões em risco de contrair a doença (De lana & De menezes machado, 2017; Bocchi *et al.* 2017; Dye-Braumuller *et al.*, 2021; Martín-Escolano *et al.*, 2022). Atualmente, nos Estados Unidos da América existem mais de 300.000 pessoas infectadas com *T. cruzi* de acordo com os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (Cantey *et al.*, 2023) e 80.000 na Europa (Antinori, 2017). Em todo o mundo, a OMS estima que ocorram 56.000 novos casos anualmente e que 12.000 pessoas morram anualmente de DC (WHO, 2015).

Tal facto ocorre, pois os fármacos de eleição utilizados na quimioterapia contra a DC (nifurtimox e benznidazol) (Rassi *et al.* 2012), tem se demonstrado insatisfatórios no combate da mesma, principalmente na fase crônica, devido à baixa eficácia, efeitos colaterais e ainda aliado ao fato de existirem cepas resistentes a eles (García-Huertas & Cardona-Castro, 2021). Por isso, é importante o estudo deste protozoário, a fim de compreender as interações patógeno-hospedeiro até o estabelecimento da doença e mecanismos de escape utilizado pelo mesmo, confundindo o sistema imunológico do hospedeiro. Nos subcapítulos subsequentes serão abordados aspetos relacionados à descoberta da doença de Chagas, classificação e distribuição das unidades discretas de tripagem de *T. cruzi*, as formas de transmissão e ciclo de vida de *T. cruzi*, impacto clínico da doença de Chagas, interações patógeno-hospedeiro, a descoberta e importância da P21 na interação patógeno-hospedeiro.

1.2. HISTÓRIA DA DESCOBERTA DA DOENÇA DE CHAGAS E ORIGEM DE *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas foi descoberta por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas¹, quando trabalhava como médico no Ministério da Saúde e Higiene Pública do Brasil. Chagas, nasceu aos 9 Julho de 1878 em uma fazenda de café que dista 20 km da pequena cidade de Oliveira do interior de Minas Gerais. Seu pai José Justiniano das Chagas dono de uma modesta plantação

¹ Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1878-1934) nascido no bairro de Oliveira em Minas Gerais, era médico, cientista e microbiologista. Para além de ter descoberto a doença de Chagas, ilustrou o género do fungo parasita *Pneumocystis*, que mais tarde se destacou por estar ligado a Pneumonia pneumocystis em pacientes com AIDS (Redhead *et al.*, 2006; Aliouat-Denis *et al.*, 2009).

Aos 23 de Julho de 1904 Chagas se casou com a Iris Lobo, foram morar em uma pequena casa alugada na rua Voluntários da Pátria, em Botafogo. Aí nasceu Evandro Chagas, em 10 de agosto de 1905. Pouco tempo depois, a família mudou-se para uma residência mais ampla na avenida Izabel de Pinho, também em Botafogo. Nessa casa nasceu Carlos Chagas Filho, aos 12 de setembro de 1910. Maurício, o terceiro filho do casal, nascido em Juiz de Fora, morreria precocemente com apenas 1 mês de vida. Chagas faleceu no dia 8 de Novembro de 1934 aos 56 anos de idade devido a complicações cardíacas (Kropf & Lacerda, 2009, p.4).

de café morreu quando Chagas tinha 4 anos de idade deixando a sua mãe Mariana Cândida Chagas com 4 crianças pequenas (Lewinsohn, 2003). A mãe de Chagas queria que ele fosse engenheiro de minas, mas, um dos seus tios, um médico de amplos interesses culturais, convenceu-o que poderia lutar contra inúmeras doenças das quais padecia a mão-de-obra naquela época, assim que o país conseguisse independência econômica (Chagas filho, 1993).

Nessa época existiam cerca de 10 milhões de habitantes no território Brasileiro e havia relatos de doença. Rio de Janeiro era a capital Federal e um dos focos de doenças infecciosas, tais como a febre amarela, tuberculose, varíola e a peste bubônica. Essas enfermidades eram surtos frequentes em ondas epidêmicas tal fato ocorria, pois, a cidade apresentava ruas não pavimentadas, atravessadas por esgotos abertos e cheias de excrementos e sujidades (Lewinsohn, 2003). Em 1896 Chagas ingressou a Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro. Formou-se em Medicina com a tese sobre a Malária realizada no Instituto Soroterápico Federal em 1903, sob a orientação de Oswaldo Cruz². Em Junho de 1907, Chagas foi enviado para realizar campanha contra a malária na região norte de Minas Gerais. Na época, a doença prejudicava o progresso do prolongamento da estrada de ferro entre Corinto e Pirapora (Kropf & Sá, 2009; Benchimol *et al.*, 2008; Coura *et al.* 2014; Chao *et al.*, 2020).

Em um pequeno povoado de São Gonçalo das Tabocas (renomeada Lassance, após a inauguração da estação ferroviária em fevereiro de 1908 em homenagem ao engenheiro Ernesto Lassance Cunha). Chagas instalou um consultório que era uma sombra de um barraco rústico e ao fundo com um vagão ferroviário abandonado que servia como dormitório e laboratório. E ao coordenar a campanha profilática ele coletou e examinou espécies da fauna Brasileira, motivado pelo crescente interesse em entomologia e protozoologia áreas de especial relevância na agenda de pesquisa do Instituto de Manguinhos (Benchimol e Sá, 2005, 2006). Chagas examinou o sangue de um saguí (*Callithrix penicillata*), uma das espécies da fauna Brasileira, no Instituto de Manguinhos em 1908. Identificou um protozoário do gênero *Trypanosoma* que denominou *Trypanosoma minensis*, no entanto essa nova espécie não era patogênica para esses macacos (Chagas, 1908).

Neste período, Chagas ouviu falar de um inseto hematófago que proliferavam nas cabanas de pau-à-pique na região do engenheiro Cornélio Homem Cantarino Mota, esse inseto era

² Oswaldo Gonçalves Cruz's (1872-1917), era filho de Bento Gonçalves Cruz (1845-1892), um médico de Rio de Janeiro, e Amália Taborda Bulhões (1851-1922). Formou-se em Medicina em 1892, ano de morte de seu pai. Em 1893, um ano após sua formatura, Oswaldo casou-se com Emília Fonseca, vulgo Miloca, com quem teve cinco filhos. 1903-1909 ocupou simultaneamente a posição de Diretor do Instituto de Manguinhos e Diretor Geral de Saúde Pública. Em 1907, ganhou medalha de ouro no XIV Congresso Internacional de Higiene e Demografia, realizado em Berlim pelos seus trabalhos sanitários. Foi responsável pelo controle de malária, peste bubônica e febre amarela no Brasil. Morreu aos 44 anos de idade devido a falência renal (Daniel-Ribeiro & de Lima, 2020).

popularmente conhecidos como barbeiro³. Ao analisar o intestino desses insetos, na época eram designados *Conorrimus megistus* (designação atual *Panstrongylus megistus*), encontrou formas flageladas de protozoários, as “chritídias” (atualmente conhecidas como epimastigotas). Ele supôs que poderiam ser um estágio evolutivo do *Trypanosoma minensis* (Kropf & Sá, 2009; Coura et al., 2014). Ciente da importância destes insetos hematófagos e por não possuir condições para elucidar melhor o assunto. Chagas enviou algumas amostras de insetos ao Instituto de Manguinhos para o Oswaldo Cruz. Em Manguinhos, os parasitas presentes no intestino do inseto hematófagos foram inoculados em saguís (*Callithrix penicillata*) criados no laboratório (livres de infecção). Seguidamente Cruz informou a Chagas que havia encontrado formas de tripanossomos no sangue de animais que adoeceram (Chagas, 1912, 1922; Kropf & Sá, 2009; Coura et al. 2014).

Passados vinte a trinta dias, Chagas regressou ao Instituto de Manguinhos e examinou o sangue desses macacos novamente. Inicialmente ele observou as formas flageladas em lâminas contendo sangue e coberta com lamínula, fixou e corou algumas lâminas com os parasitas com isso, constatou que estas formas apresentam características distintas de *Trypanosoma minensis* (Chagas, 1922). Duas semanas antes de Chagas descobrir a doença em humanos, ele visitou e passou a noite na casa dos pais de Berenice (primeira paciente que ele consultou e descobriu a doença). Nesse momento, ele observou que a casa da Berenice estava infestada por insetos barbeiro (Lewinsohn, 2003). Ao analisar o sangue de um gato observou *T. cruzi* e ainda teve a oportunidade de observar uma grande quantidade de insetos picando as pessoas que ali moravam e inclusive a Berenice. Curiosamente, quando Chagas analisou o sangue da Berenice não observou a presença dos parasitas (Lewinsohn, 2003, Chagas, 2008).

Contudo, somente no dia 14 de Abril de 1909, quando Chagas consultou a Berenice, uma criança de 2 anos de idade, em seu modesto consultório, concluiu que o achado observado na residência da menina estava relacionado a sua condição de saúde. No momento que Berenice foi levada ao consultório de Chagas, ela estava sentada no colo da mãe e há oito dias estava com febre alta e depois começou a inchar (Chagas, 1922; Lewinsohn, 2003; Kropf e Lima, 2022). Os sinais clínicos descritos por Chagas foram os seguintes: temperatura de 40 °C, sinais de toxemia aguda, hepatoesplenomegalia, linfonodos aumentados de tamanho e edema facial, que é o sinal mais significativo da doença na fase aguda (Lidani et al., 2019; Lewinsohn, 2003).

³ Termo “barbeiro”, “barber”, “chupão” ou “chupança” é usado popularmente para designar ao insecto transmissor da doença de chagas é devido ao habito de realizar o repasto sanguíneo na face dos hospedeiros (Lewinsohn, 1979).

Seguidamente, Chagas analisou o sangue de Berenice e observou a presença de parasitas flagelados, com morfologia similar aos parasitas observados em macacos saguís, esta foi a descoberta da tripanossomíase Americana (Coura *et al.* 2014). Porém, Chagas não possuía condições que lhe permitissem identificar o microrganismo observado. Por isso, ele enviou amostras ao Oswaldo Cruz e escreveu uma carta relatando que observou a presença de tripanossoma patogênico no sangue de alguns pacientes (Lewinsohn, 2003; Steverding, 2014)

Depois de Chagas estudar a morfologia e biologia do parasita, realizou experimentos laboratoriais em macacos *Callithrix*, camundongos, coelhos, porquinho-da-índia e cães. A infecção pelo protozoário em estudo (*T. cruzi*) era obtida por picadas do inseto vetor (*Panstrongylus megistus*, no qual estudou o ciclo evolutivo de *T. cruzi*) mas a sua grande maioria era por inoculação. Assim, Chagas confirmou a infecção pelo parasita recém descoberto nesses mamíferos (Chagas, 1916). E ainda, focando nas observações feita por Chagas, os gatos foram considerados os prováveis reservatórios da doença aliado ao fato de serem animais domésticos (Chagas, 1922), ele estudou também a fase aguda, crônica e a patogênese da doença (Chagas, 1916; Chagas e Villela, 1922).

Analisou os pulmões dos animais infectados e descobriu o que considerou ser a divisão múltipla do parasita (esquizogonia), e estabeleceu uma diferença substancial em relação aos tripanossomas já conhecidos, cuja multiplicação ocorria por fissão binária. Devido a tal fato, decidiu criar um novo gênero (*Schizotrypanum*), com a finalidade de classificar a espécie recém-descoberta, a qual designou *Schizotrypanum cruzi* em homenagem ao seu mentor Oswaldo Cruz (Delaporte, 2003; Kropf & Sá, 2009).

Em 1908, Chagas submeteu um trabalho para publicação na revista do instituto für Schiffs- und Tropenkrankheiten (instituto de doenças Marítimas e Tropicais) em Hamburgo, Alemanha com o propósito de anunciar a sua descoberta, concretamente os dois tripanossomas, *Trypanosoma minensis* e *Schizotrypanum cruzi* (Chagas, 1909). Porém, na época vários estudos estavam voltados aos tripanossomídeos causadores da Tripanossomíase Africana “doença do sono” e para diferenciar ambas enfermidades, Chagas designou a enfermidade por ele descoberta de Tripanossomíase Americana (Lewinsohn, 1979).

Em 1910, o presidente da Academia Nacional de Rio de Janeiro, Miguel Couto propôs que a doença descoberta por Chagas fosse designada de *Doença de Chagas* em homenagem ao Carlos Chagas, devido aos seus enormes feitos sobre a nova tripanossomíase (Lewinsohn, 1979, 1981). Devido ao empenho no estudo da doença de Chagas, em 1912 Chagas recebeu o prêmio Schaudinn de protozoologia do Instituto de doenças Marítimas e Tropicais de Hamburgo e em

1913 foi indicado ao prêmio nobel de Medicina (Coutinho *et al.*, 1999). No ano de 1922 o agente etiológico da doença de Chagas foi nomeado *Trypanosoma cruzi* por Carlos Chagas, em homenagem ao seu amigo e mentor Oswaldo Cruz (Lewinsohn, 1979, 1981, 2003). Nos anos subsequentes a investigação pela doença de Chagas intensificou-se, em outras regiões das Américas, graças a tal facto, foram relatados os primeiros casos da doença em El Salvador (1913), Perú e Venezuela (1919), Costa Rica (1922), Paraguai (1924), Guatemala (1933), Chile (1937), México (1938), Bolívia (1942), Colômbia (1947), Nicarágua e Argentina (1949) e Honduras (1960) (Lidani *et al.*, 2019).

A origem da clade de *T. cruzi* e de *T. cruzi cruzi per se* é suportada em duas hipóteses supercontinente meridional e de sementeira por morcego. A primeira hipótese é baseada em evidências filogenéticas que indicam que a clade de *T. cruzi* tem origem no supercontinente meridional de Gondwana onde os marsupiais eram os mamíferos mais predominantes na fauna a cerca de 45 milhões de anos atrás (Hamilton & Stevens, 2017; Stevens *et al.*, 1999). Fato que ocorreu devido a análise filogenética de 18S rRNA que demonstrou que os tripanossomas Salivaria (transmitidos através de picada) divergem por aproximadamente 100 milhões de anos dos Stercoraria (transmitidos por contaminação fecal, nos quais o *T. cruzi* faz parte). Uma vez que o sul da América, Antártica e a Austrália encontra-se separados da África, tal fato sugeriu que *T. cruzi* e outros tripanossomas relacionados evoluíram isoladamente nos primeiros mamíferos terrestre (Hamilton *et al.*, 2012; Steverding, 2014).

No entanto, graças aos avanços alcançados em métodos de biologia molecular, foi possível demonstrar que a DC foi introduzida na América latina ~7-10 milhões de anos atrás. A evidência mais atinca da infecção por *T. cruzi* é devido a detecção do DNA do cinetoplasto de *T. cruzi* em uma múmia um ser humano Chinchorro de 9000 anos de idade, da zona costeira de Atacama (Aufderheide *et al.*, 2003). Supõe-se que o povo Chinchorro tinha um estilo de vida nômade, por isso, provavelmente tenha participado no ciclo silvestre de *T. cruzi* gradualmente. O povo Chinchorro tornou-se sedentário e devido a esse fato contribuiu para o estabelecimento do ciclo doméstico de transmissão de *T. cruzi* que foi facilitado pela capacidade do vetor de adaptar-se facilmente a vegetação aberta (Dias *et al.*, 2011).

Aliado a esse fato, propõe-se também que as pessoas do período pré-histórico possivelmente introduziram e participaram no ciclo silvestre de *T. cruzi* e no estabelecimento do ciclo doméstico (Steverding, 2014). Tais achados foram confirmados com evidências de infecção por *T. cruzi* observadas em múmias de culturas subsequentes ao povo Chinchorro, que viviam na mesma área antes da conquista Espanhola no século XVI. Foi também observada a

presença DNA de *T. cruzi* em achados paleontológicos de Chile/Perú e Brasil datando de 7050 anos a.C e 2500-5000 anos a.C, respectivamente. Com esses achados, supõe-se que a doença de chagas é originária da região dos Andes (Steverding, 2014).

Todavia, evidências moleculares recentes demonstraram que o ancestral de *T. cruzi* foi introduzido nas Américas do Sul por morcegos há aproximadamente 7-10 milhões de anos atrás, correspondente a segunda hipótese, conhecida como hipótese de sementeira por morcego (Hamilton *et al.*, 2012; Lidani *et al.*, 2019; Steverding, 2014; Zingales & Bartholomeu, 2021). A hipótese de sementeira por morcegos é reforçada pelo fato de *T. marinkellei* encontrado em morcegos da América do Sul ser o parente com características genéticas mais próximas de *T. cruzi*. Essas espécies divergem por aproximadamente 6,5-8,5 milhões de anos e podem ser consideradas subespécies (Machado e Ayala, 2001; Cavazzana, 2010; Hamilton *et al.*, 2004, 2007; Lewis *et al.* 2011; Hamilton & Stevens, 2017). Outra recente descoberta que reforça essa hipótese, são as espécies *T. erneyi* e *T. livingstonei* descritas em morcegos de Moçambique (Lima *et al.*, 2012) e *T. dionisii* em morcego do velho e novo mundo consideradas parentes próximos de *T. cruzi* (Cavazzana, 2010). Aliado ao fato de o *T. cruzi* ter sido detectado em morcegos da América do Sul com um genótipo específico, até o momento a linhagem TcBat foi encontrada em morcegos (Hamilton *et al.*, 2012; Hamilton & Stevens, 2017). A TcBat é mais relacionada a linhagem TcI, primeiramente associado aos gambás e percevejos do gênero *Rhodnius* em ecótopos arbóreos (Hamilton *et al.*, 2012). Com isso, é razoável propor que o ancestral comum da clade dos membros de *T. cruzi* era um tripanossoma proveniente de morcego (Stadelmann, 2007).

Apesar de tais achados, somente no ano de 1909 a doença foi mencionada tornando os achados de Carlos Chagas um feito único na história da Parasitologia e Medicina, sendo que ele fez a descrição dos aspectos chaves da nova doença tropical. Primeiramente ele anunciou a descoberta do inseto vetor hematófago, seguidamente publicou um reporte descrevendo as manifestações clínicas da doença aguda no homem, morfologia, ciclo evolutivo de *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado e vertebrado, epidemiologia e profilaxia da doença (Lewinsohn, 1979; Lidani *et al.*, 2019; Chao *et al.*, 2020).

Lannes-vieira *et al.* (2010) referem que o seu percurso histórico (**figura 1**) pode ser dividida em três fases:

A 1ª fase (1909 a 1934) é caracterizada pelos trabalhos de Chagas e pela polêmica em torno da definição e legitimação da doença e problema social.

A 2ª fase (1935-1960) após a morte de Chagas, Mazza e Romanã confirmaram a forma aguda da doença na Argentina, nesta fase Evandro Chagas (filho de Carlos Chagas) e Emmanuel Dias identificaram caráter endêmico e crônico da doença.

A 3ª fase (de 1961 até a atualidade) é caracterizada pelo desafio tanto para o controle quanto para a compreensão dos diversos aspectos da doença tais como a implementação de políticas nacionais e internacionais de saúde de forma constante.

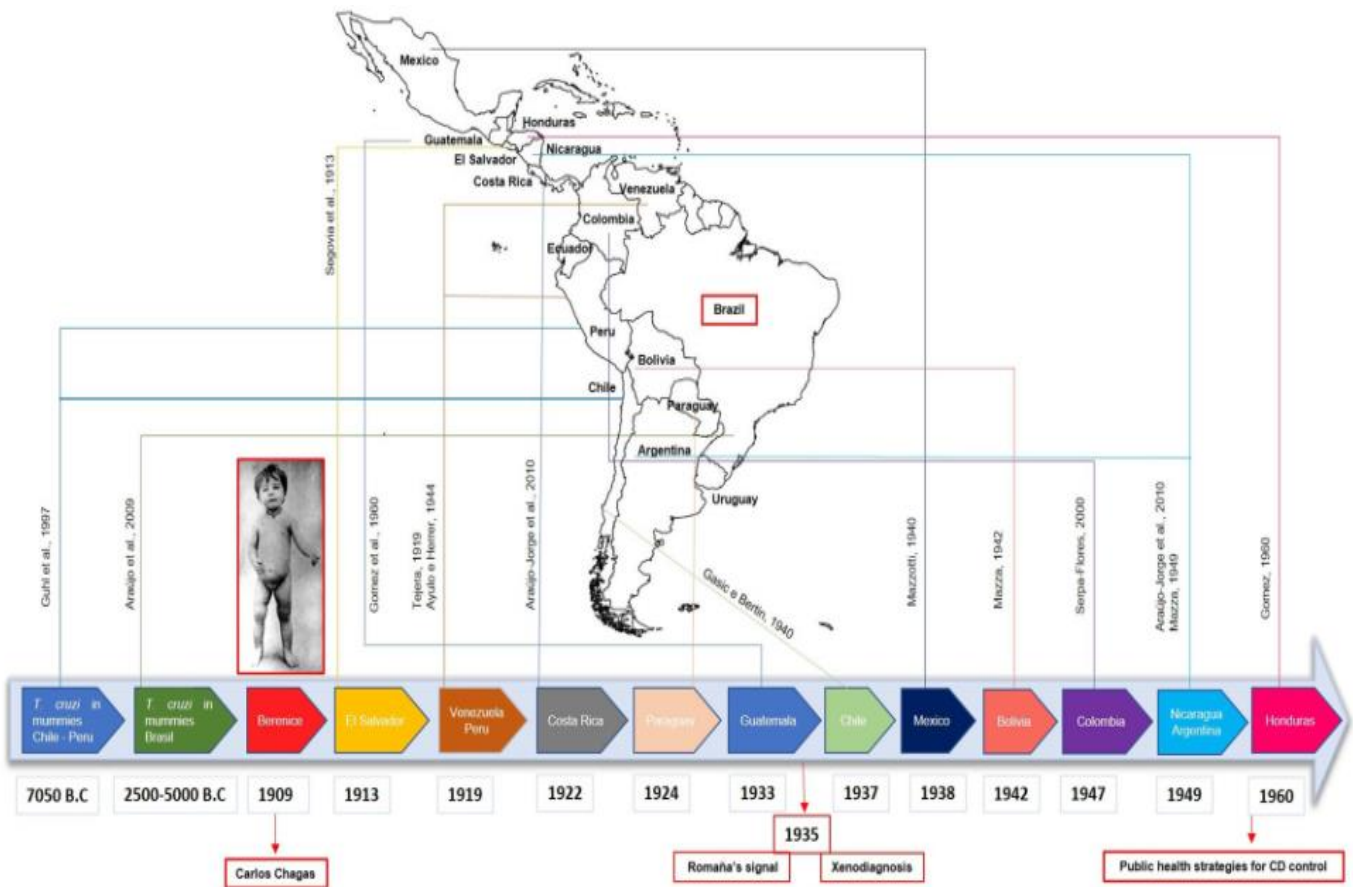


Figura 1. Linha cronológica da descoberta da doença de Chagas. Fonte: Lidani et al., 2019.

1.3. FORMAS DE TRANSMISSÃO DE *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas na versão clássica é transmitida por insetos da subfamília *Triatominae* quando fazem repasto sanguíneo e defecam no local da picada, conforme ilustrado na Figura 2. Na literatura são descritas 154 espécies de triatomíneos nas Américas e 2 fossilizadas que podem transmitir *T. cruzi*. No Brasil são conhecidas 65 espécies e aproximadamente 20 delas tem importância epidemiológica reconhecida (Coura et al., 2014; Silva et al., 2019; Honorato

et al., 2021). A existência dos insetos triatomíneos é reconhecida desde o século XVI (Lent & Wigodzinski 1979) mas, somente em 1773 foram formalmente descritos por De Geer e a infecção por *T. cruzi* foi descrita por Carlos Chagas pela primeira vez em 1909 (Galvão & Justi, 2015).

Dados paleontológicos demonstraram que os triatomíneos e os tripanossomas estavam associados na época de Oligocena, idade correspondente aos únicos dois fósseis de triatomíneos. *Triatoma dominicana* foi descrito a partir de fósseis de âmbar dominicano, juntamente com o que pareciam ser gotículas fecais contendo protozoários descritos como ancestrais do gênero *Trypanosoma* (Poinar, 2005). Mais tarde, na espécie *Panstrongylus hispaniolae*, outro fóssil de triatomíneo, foram observadas formas epimastigotas de *Blastocrithidia* (Kinetoplastida: *Trypanosomatida*) em seu intestino (Poinar, 2005, 2013; Galvão & Justi, 2015). Entretanto, atualmente as espécies de triatomíneos consideradas como as mais importante na transmissão da DC são o *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (Steverding, 2014; Hamilton & Stevens, 2017).

Quanto a eficiência na transmissão do protozoário *T. cruzi*, estudos realizados, demonstraram que as bactérias presentes no intestino de triatomíneos podem interferir na eficiência de infecção (Gumiel et al., 2015). Ainda foi demonstrado que o sucesso da infecção provavelmente esteja relacionado ao equilíbrio entre as populações de microorganismos e protozoários. Nesta concorrência por nutrientes no intestino, a microbiota pode aumentar indiretamente a expressão de moléculas antiparasitárias e induzir a resposta imune do inseto (Mesquita et al., 2015). Em estudo de comparação de espécimes de *T. infestans* infectados com *T. cruzi* não foi observado aumento significativo nas taxa de mortalidade ou atraso no desenvolvimento do inseto (Schaub, 1988).

Entretanto, em outro estudo, apesar de ter-se observado que o protozoário não causa alterações prejudiciais ao tecido intestinal do inseto vetor, ele causa inúmeras alterações fisiológicas, morfológicas e comportamentais. Por exemplo, foi demonstrado que a infecção por *T. cruzi* aumenta a capacidade dos hospedeiros de *Mepraia spinolai* de detectar vertebrados e diminui o tempo entre a alimentação e a defecação (De Oliveira et al., 2018). Supõe-se que essas alterações aumentem a transmissão do parasita e, conseqüentemente, reflitam a importância epidemiológica desse vetor na doença de Chagas. Ademais, Fellet et al., 2014) observaram redução no desempenho reprodutivo de *R. prolixus* e que provavelmente o parasita reduz a aptidão dos insetos e afeta a sobrevivência dos mesmo (De Oliveira et al., 2018).

Além disso, outros estudos constataram que a infecção por *T. cruzi* aumentou a taxa de mortalidade de *M. spinolai*, reduziu a oviposição e a taxa de eclosão de ovos de *P. megistus*, diminuiu a aptidão reprodutiva de *R. prolixus* sob condições de temperatura semelhantes às do ambiente natural em que esta espécie é encontrada, e no caso de algumas linhagens, pode ter prolongado o período de muda e reduzido a longevidade dos insetos (Guarneri & Lorenzo, 2017). Em outro estudo, descobriu-se que espécimes infectados de *Triatoma dimidiata*, tinham asas maiores em relação aos insetos não infectados; o que sugere uma possível relação entre essa diferença na morfologia e o potencial de dispersão do hospedeiro, o que poderia contribuir para a transmissão do protozoário (Nouvellet et al., 2011).

T. infestans é o vetor mais importante na Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai, Uruguai e Perú. Na Colômbia, Venezuela e América central destaca-se o *Rhodnius proxilus*, no equador e América central o *T. dimidiata*, no Panamá é o *Rhodnius pallescens*, e nos Estados Unidos das Américas na parte sul a espécie mais destacada é a *Triatoma gerstaeckeri*, seguida da *T. lecticularia* e *T. sanguisuga* (Garcia et al., 2016). Quanto a origem, supõe-se que a espécie *T. infestans* seja oriundo da Bolívia, onde é encontrada em áreas domésticas, peridomésticas e silvestres. Tal hipótese sustenta-se no fato de ter se observado alta variabilidade genética de *T. infestans* em escala microgeográfica entre vetores selvagens no vale dos Andes Boliviano. E que provavelmente foi transportada para Argentina, Chile, Paraguai, Uruguai e Brasil onde tornou-se exclusivamente doméstica (Coura e Dias, 2009; Noireau et al., 2009; Coura, 2015).

Desde a descoberta da DC foram implementados diversos programas com o objetivo de controlar a doença. Esses programas inicialmente estavam focados no controle do vetor. As medidas controle físico e químico foram a primeira linha de investigação com o objetivo de eliminar o vetor nas habitações. Esta medida incluía a melhoria das habitações e ainda a educação inclusiva das populações (Dias, 2015; Gorla & Hashimoto, 2017).

A segunda linha de investigação envolvia o desenvolvimento de estruturas de pesquisa complexas com cardiologistas, sorologistas e patologistas. Inicialmente se pretendia eliminar os vetores triatomíneos, erradicando-os das habitações humanas com recurso a água fervida, soda cáustica, querosene, gás ciano e lança-chamas militares, mas essas medidas não foram eficazes (Dias, 2015). Por isso, foram implementadas medidas de controle utilizando diclorodifeniltricloroetano mas, este demonstrou ser ineficaz contra os triatomíneos. Entretanto, utilizando outro organoclorado, o gamma- hexaclorociclo-hexano (γ -HCH, conhecido como hexacloro de benzeno, lindano ou Gammexano) foram observados resultados satisfatórios no

Brasil por Dias e Pellegrino (1948) e na Argentina por Romãña e Abalos (Gorla et al., 2010; Dias, 2015).

Até o final da década de 1970 o hexaclorociclo-hexano (e/ou Dieldrin) foi o organoclorado mais utilizado no controle dos triatomíneos domésticos, mas, mais tarde foi substituído por piretróides sintéticos (Dias e Schofield, 1999; Coura e Dias, 2006). Ademais foram implementados programas nacionais de controle de triatomíneos, com recurso a substâncias químicas e ainda copiando a justificativa e estratégias das campanhas da malária e febre amarela. Os procedimentos operacionais destes programas eram divididos em três fases: preparatória, ataque e vigilância (Dias, 2008). A primeira fase (preparatória) envolvia reunião, organização de recursos, recrutamento, treinamento do pessoal, mapeamento da região e estudos sorológicos da população. A segunda fase (ataque) consistia em realizar pulverizações em larga escala de instalações nas regiões alvo e a terceira e última fase (vigilâncias) baseava-se na educação em saúde e discussão da comunidade com os oficiais da comunidade (Dias e Schofield, 1999; Coura, 2009).

Posteriormente, foram introduzidas outras variedades de abordagens de controle tais como, hormônios juvenis, patógenos de insetos, armadilhas impregnadas de inseticida, entre outras na década 1960 a 1970. No entanto, os inseticidas químicos continuavam sendo os que demonstravam maior eficácia e eficiência (WHO, 2002; CDCP, 2015). Porém, foi graças a iniciativa do Cone Sul (INCOSUR) que o Uruguai em 1997, Chile em 1999 e Brasil no ano de 2006, receberam certificação de interrupção da transmissão da DC pelo *Triatomas infestans*, emitido pela Organização Pan-Americana de Saúde e Organização Mundial da Saúde, cortando o ciclo doméstico da doença (Coura e Dias, 2009; Das Graças *et al.*, 2015; Coura, 2015). Com isso, onde o controle vetorial foi implementado satisfatoriamente observou-se redução no número de casos agudos e crônicos da DC e baixa prevalência sorológica da doença em crianças (OPAS, 2006; Torrico, 2014).

Por outro lado, graças as iniciativas do Pacto Andino e Centro-Americana, que eram focadas na eliminação de populações domésticas de *Rhodnius prolixus* e controle de vetores de *Triatoma dimidiata*. A Costa Rica, El Salvador, Honduras, Guatemala e Nicarágua alcançaram a declaração de livre transmissão da DC pelo vetor *R. prolixus* (Gorla & Hashimoto, 2017). Entretanto, outros vetores supracitados podem transmitir a infecção. Estudos atuais referem que a espécie *Panstrongylus megistus* é considerada o vetor mais importante e potencial transmissor da DC no Brasil. Devido a sua ampla distribuição geográfica, suscetibilidade ao *T. cruzi* e versatilidade de adaptação a ambiente doméstico mesmo sendo um vetor silvestre (Coura,

2015). Ela é amplamente observado nos biomas Brasileiros, concretamente na floresta atlântica, em áreas úmidas do cerrado e caatinga. No sul do Brasil ocorre frequentemente em ecótopos silvestres enquanto no Sudeste e Nordeste, onde tem importância epidemiológica, ocorre frequentemente em ecótopos artificiais (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2012).

Outros vetores reportados frequentemente, no sul do Brasil são o *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria*. Já no nordeste o *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus lutzi* e *Triatoma pseudomaculata* são as mais comumente reportados (Silva *et al.*, 2019). Atualmente, a espécie *Triatomas infestans*, têm baixa ocorrência mas, ainda são observadas populações residuais no Rio Grande do Sul e Bahia, fato que realça a importância da constante avaliação de vigilância entomológica (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2012).

No ciclo de transmissão de *T. cruzi*, de forma genérica são considerados o ciclo silvestre e doméstico. O ciclo silvestre envolve a interação do vetor com reservatórios mamíferos (marsupiais, roedores, tatu e primatas). Os vetores frequentemente colonizam ninhos de roedores ou hospedeiros reservatórios marsupiais (Zingales, 2018; De Medeiros *et al.*, 2022). O ciclo doméstico ou peri-doméstico envolve a interação de humanos com inseto vetor. Este colonizam ambientes domésticos e peri-doméstico, principalmente em habitações de construção precária (pau-a-pique) (Zingales, 2018). Neste ciclo os seres humanos, cães e gatos são considerados reservatórios (Rassi e Marin-Neto, 2010). Apesar desses achados, o processo de domiciliação ou domesticação dos triatomíneos ainda não está claro. Supõe-se que a evolução da hematofagia na família *Triatominae* deve ter evoluído a partir de várias linhagens de *Reduviidae*. Acredita-se que inicialmente, eles se adaptaram como predadores de sangue de forma alternativa, que foi seguida pela hematofagia obrigatória em nichos de vertebrados (Schofield 2000; Coura *et al.*, 2014).

Em termos de distribuição das espécies mais importantes na transmissão de *T. cruzi* de acordo com o ciclo. A espécie *Triatoma infestans*, é observada no ciclo doméstico mas na Bolívia é observada somente no ciclo silvestre. A *Rhodnius proxilus* ocorre em ambos os ciclos sendo encontrado em árvores de palmeira e casas humanas (Galvão & Justi, 2015). A espécie *Panstrongylus megistus* raramente ocorre no ciclo doméstico/peridoméstico, ela é predominante no ciclo silvestre podendo ser encontrada em ninhos de mamíferos, árvores em decomposição e ocas, palmeiras, base de folhas de bromélia, touceiras de agave e ainda entre raízes de árvores e fissura de rochas (Galvão & Justi, 2015; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2012).

Os fatores de riscos que podem ser associados ao estabelecimento do ciclo doméstico bem como silvestre no Brasil e mundo podem ser as construções rurais precárias próximo a

palmeiras infestadas de triatomíneos e marsupiais infectados com *T. cruzi*, desmatamento, transformação da flora e proliferação de marsupiais oportunistas em ambientes degradados (Barbosa et al., 2015; López-Monteon et al., 2019). Outros fatores de risco incluem a invasão esporádica de vetores silvestres adultos em ambientes domiciliares em destaque as espécies: *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustus* e *Panstrongylus geniculatus*, introdução da eletricidade; migração de seres humanos de áreas onde a DC é endêmica; extração de fibra de piassaba no médio e alto rio negro e o consumo de fruta contaminada ou sucos, como o açaí e outros sucos de palmeiras (Barbosa et al., 2015).

Para além da via de transmissão abordada anteriormente, *T. cruzi* pode também ser transmitido por transfusão de sangue, via transplacentária, transplante de órgãos e via oral conforme abordado anteriormente, principalmente nas áreas não endêmicas (Herrerros-cabello et al., 2019; Shikanai yasuda, 2021). A via de transmissão predominante atualmente no Brasil ainda é vetorial, exceto na região norte do país onde predomina a transmissão oral (Andrade et al., 2011; Martins-Melo et al., 2014). Apesar da transmissão vetorial e por transfusão de sangue serem relatadas como estado sob controle nas regiões endêmicas, a globalização da DC torna as formas de transmissão não vetorial potenciais barreiras no controle da doença principalmente nos países onde a doença não é endêmica. Tal achado é mais evidente nos centros urbanos onde reemergiu a transmissão por transfusão de sangue e transplante de órgãos e ainda a transmissão congênita (Shikanai Yasuda, 2021).

No entanto, os parâmetros técnicos que são avaliados antes da transfusão de sangue nomeadamente, ensaio de doadores de sangue, triagem sistemática de anticorpos anti-*T. cruzi*, análise de aspetos intrínsecos do doador ou receptor (carga parasitária e estado imunológico), desfavorecem a transmissão por transfusão de sangue (Lidani et al., 2019). Nos países onde a DC é endêmica, para controlar a transmissão por transfusão de sangue, foi implementada a triagem universal em todos os candidatos a doadores de sangue, através da realização de teste sorológico confiável, reprodutível e de alto performance com cerca de 99-100%, seguido de teste confirmatório com pelo menos 95% de especificidade (PAHO, 2019; Shikanai Yasuda, 2021).

Em alguns países Europeus, foram implementadas ou realizadas alterações nas recomendações para triagem de doadores de sangue com probabilidade de infecção por *T. cruzi*. No Reino Unido em 1999, seguido pela Espanha em 2005, França e Suécia em 2009, Suíça, Bélgica, Itália, Portugal, as medidas foram implementadas nesses países pois neles residem a maioria dos imigrantes latino-americanos (Requena-Méndez et al. 2014; Antinori et al., 2017).

Porém, nos Estados Unidos, a triagem não inclui doadores nascidos de mães que viveram em áreas endêmicas ou doadores que viveram menos de cinco anos em áreas endêmicas nem doadores que viajaram durante três meses para áreas de transmissão vetorial (Custer et al., 2012; Shikanai Yasuda, 2021).

Por outro lado, países da região do Pacífico Ocidental não possuem políticas de saúde focadas na identificação sistemática de indivíduos em risco de infecção por *T. cruzi*. Japão e China, não têm políticas descritas de adiamento de doadores em risco. E na Austrália, outro país onde a DC é emergente, a triagem é realizada por meio de questionário para identificação de doadores de risco por meio de dados clínicos e epidemiológicos e exclusão dos afetados (Jackson *et al.*, 2014).

A transmissão através de transplante de órgão sólidos (TOS ou SOT) é conhecida desde a década de 80 nas regiões endêmicas (Chocair *et al.*, 1981). Propõe-se que ela surgiu em centros urbanos nas regiões endêmicas e não endêmicas atualmente esta via tem demonstrado alto impacto principalmente em receptores imunodeprimidos (CDC, 2006). No entanto, antes da realização de transplante de órgãos sólidos são considerados alguns aspectos técnicos, a fim de realizar a operação com o máximo cuidado possível. Pois em caso de infecção por *T. cruzi*, a reação a infecção pode ser exacerbada devido ao estado imunossupressor do receptor de órgão (Shikanai Yasuda, 2021). Quanto ao risco de transmissão por via congênita, crianças nascidas de mães infetadas têm cerca de 5% de chance de nascerem infectadas por *T. cruzi* de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015). Na América latina, estima-se que existem 1.124.930 mulheres com idade compreendida dos 15 aos 44 anos infectadas por *T. cruzi*. Supõe-se que a variabilidade genética do parasita e as respostas imune materno-fetais sejam os principais fatores dos quais depende a transmissão materno-fetal (Howard *et al.*, 2015).

Nos EUA é estimado que de 63 a 315 recém-nascidos têm infecção congênita por *T. cruzi* e na Europa cerca de 20 a 183 recém-nascidos (Basile *et al.*, 2011). Porém, a grande maioria dos casos de DC congênita é subdiagnosticada, pois, geralmente, os recém-nascidos infectados são assintomáticos ou apresentam sintomas inespecíficos, como baixo peso ao nascer, dificuldade respiratória e miocardite (Hotez *et al.*, 2012; Antinori *et al.*, 2017). Em alguns casos que a doença é sintomática, os recém-nascidos apresentam altas taxas de parasitemia e a infecção congênita pode ser confirmada pela observação direta de tripomastigotas de *T. cruzi* sob microscopia de amostras colhidas do cordão umbilical ou de sangue periférico (Basile *et al.*, 2011).

Por outro lado, no Japão, estima-se que cerca de 30 recém-nascidos foram infectados com *T. cruzi* na última década mas, esse número é subdiagnosticado uma vez que conforme abordado anteriormente este país não têm políticas voltadas a identificação de possíveis infecções com *T. cruzi* (Jackson *et al.*, 2014; Imai *et al.*, 2014).

Entretanto, após a implementação de medidas de erradicação dos vetores e o estabelecimento de testes de rotina para detecção de *T. cruzi* em bancos de sangue, a via oral emergiu como uma importante forma de transmissão da DC. Além disso, alguns casos de origem alimentar foram relatados em regiões onde o controle intradomiciliar e peridomiciliar de triatomíneos tem sido eficaz (Lidani *et al.*, 2019).

A via de transmissão oral, foi demonstrada pela primeira vez em modelos animais em 1913 (Brumpt, 1928), quando foi proposto que os reservatórios poderiam adquirir o parasita através da alimentação de insetos contaminados (Dias, 1933) (Shikanai Yasuda, 2021). Fato que foi confirmado posteriormente através de infecções experimentais em modelo murino usando sangue contaminado contendo as formas tripomastigotas, urina e fezes de triatomíneos contaminados ou cultura de *T. cruzi* (Mayer, 1961). A transmissão oral por *T. cruzi* em seres humanos é descrita como surtos de origem pontual, onde grupos de pessoas compartilharam alimentos ou bebidas contaminadas durante um evento (Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012). Os primeiros casos reportados de transmissão da DC por via oral foram no território Brasileiro, no Rio Grande do Sul por Silva *et al.* (1968) e no Pará por Shaw *et al.* (1969), em ambos casos a infecção ocorreu devido a ingestão de refeição compartilhada (Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012).

A infecção por *T. cruzi* também pode ocorrer por acidente de trabalho no laboratório, apesar de ser uma forma de transmissão rara. A infecção geralmente ocorre devido a manipulação de instrumentos cortantes ou perfurantes ou por contato da mucosa com material (meio de cultura) contendo parasitas vivos são de alto risco durante manipulação de cultura de parasitas (Kinoshita-Yanaga *et al.*, 2009). Em todo o mundo foram notificados 65 casos de transmissão laboratorial de *T. cruzi* geralmente quando os funcionários manipulavam triatomíneos contaminados ou culturas de parasitas (Herwaldt *et al.*, 2018). Recentemente foram reportados dois casos de transmissão laboratorial. Ambos casos ocorreram no mesmo laboratório e ambos funcionários sofreram ferimento com agulha com potencial exposição a uma cepa brasileira de *T. cruzi*. Foram submetidos a tratamento com sucesso (Budnick *et al.*, 2019).

1.4. CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi*

O ciclo evolutivo de *T. cruzi*, na versão clássica, envolve dois hospedeiros, sendo um hospedeiro vertebrado mamífero e outro hospedeiro invertebrado, o inseto vetor, e ainda são observados quatro estágios de vida do parasita ou formas evolutivas. O hospedeiro vertebrado mamífero é infectado quando o inseto vetor infectado faz o repasto sanguíneo e defeca no local da picada inoculando as formas tripomastigotas metacíclicas (MT) que não são divisíveis (Nagajyothi *et al.*, 2012; Echavarría *et al.*, 2021). Inicialmente, as formas tripomastigotas metacíclicas ligam-se a uma ampla gama de receptores de células nucleadas fagocíticas e não fagocíticas e entram em um vacúolo ligado a membrana denominada vacúolo parasitóforo (VP ou TcPV) (Barrias *et al.*, 2013; Martín-escolano *et al.*, 2022; Tyler *et al.*, 2003).

Posteriormente, os parasitas diferenciam-se em formas redondas pequenas designadas amastigotas e estas rompem o VP, passando para o citoplasma da célula hospedeira (**Figura 2**). As formas amastigotas em um único ciclo lítico proliferam por fissão binária por vários ciclos até que o citoplasma da célula se encontra cheio. Neste ponto, as amastigotas se alongam, readquirem os longos flagelos e diferenciam-se em tripomastigotas não replicativos (Carrea & Diambra, 2016; Dumoulin & Burleigh, 2018; Martín-Escolano *et al.*, 2022). As formas tripomastigotas por apresentarem movimentos contínuos e intensos, induzem à lise da membrana celular da célula hospedeira. Depois de romperem a célula hospedeira, podem invadir células adjacentes, entrar na circulação sanguínea ou linfática e disseminar-se por todo o organismo, conforme ilustrado na **Figura 2** (Martín-escolano *et al.*, 2022).

Quando os insetos vetores triatomíneos fazem o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero são infectados com as formas tripomastigotas sanguíneas (TSs) e estes diferenciam-se em epimastigotas e proliferam nas glândulas salivares. Seguidamente, as epimastigotas migram para o intestino, ligam-se a cutícula do intestino e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (Martín-escolano *et al.*, 2022). Esta etapa é descrita como estando dependente de fatores ambientais como, temperatura, disponibilidade de nutrientes e do stress oxidativo e osmótico (Taylor *et al.*, 2020).

As formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas geralmente são encontradas no trato intestinal e na urina do inseto vetor. As epimastigotas são alongadas com comprimento de 20-40µm e apresentam um flagelo que se origina na posição anterior do núcleo. Elas multiplicam por fissão binária longitudinal até que se esgotem os nutrientes e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas por um processo denominado metaciclogênese na porção

posterior do intestino e nas excretas, essas formas são infectivas aos hospedeiros vertebrados e não replicativas (De Lana & De Menezes Machado, 2017; Martín-escolano *et al.*, 2022).

Quanto as formas tripomastigotas são descritas as formas tripomastigotas metacíclicas, as encontradas no inseto vetor, tripomastigotas sanguíneas, observadas na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero vertebrado e as tripomastigotas derivado de cultura de tecidos que são originadas de cultura de célula. As tripomastigotas apresentam um grande flagelo livre que se origina após o núcleo, esta forma é extracelular, não se multiplica medem cerca de 20 μm (Memoranda Immunology of Chagas Disease, n.d.;De Lana & De Menezes Machado, 2017; Martín-Escolano *et al.*, 2022).

As amastigotas são formas arredondadas com aproximadamente 25 μm de largura e 3-5 μm de diâmetro, com curto e discreto flagelo bastante rente ao corpo da célula. Multiplicam-se por fissão binária longitudinal, pode ser encontrada no meio intracelular ou extracelular, órgão alvos sangue e estômago (Tyler & Engman, 2001; De Lana & de Menezes Machado, 2017).

Outras formas descritas na literatura que *T. cruzi* pode apresentar foram denominadas de zóide, elas são intracelulares, resultam da diferenciação inicial de tripomastigotas metacíclicos através de células em divisão resultando em amastigotas zoide, células com cinetoplasto mas sem núcleo, morrem rapidamente por serem degradados pela célula hospedeira (Martín-Escolano *et al.*, 2022). Recentemente, foi relatada a ocorrência de formas amastigotas quiescente ou dormentes. Supõe-se que as formas amastigotas podem tornar-se metabolicamente quiescentes, fato importante na resistência aos fármacos utilizados no tratamento contra a CD (Sánchez-Valdéz *et al.*, 2018).

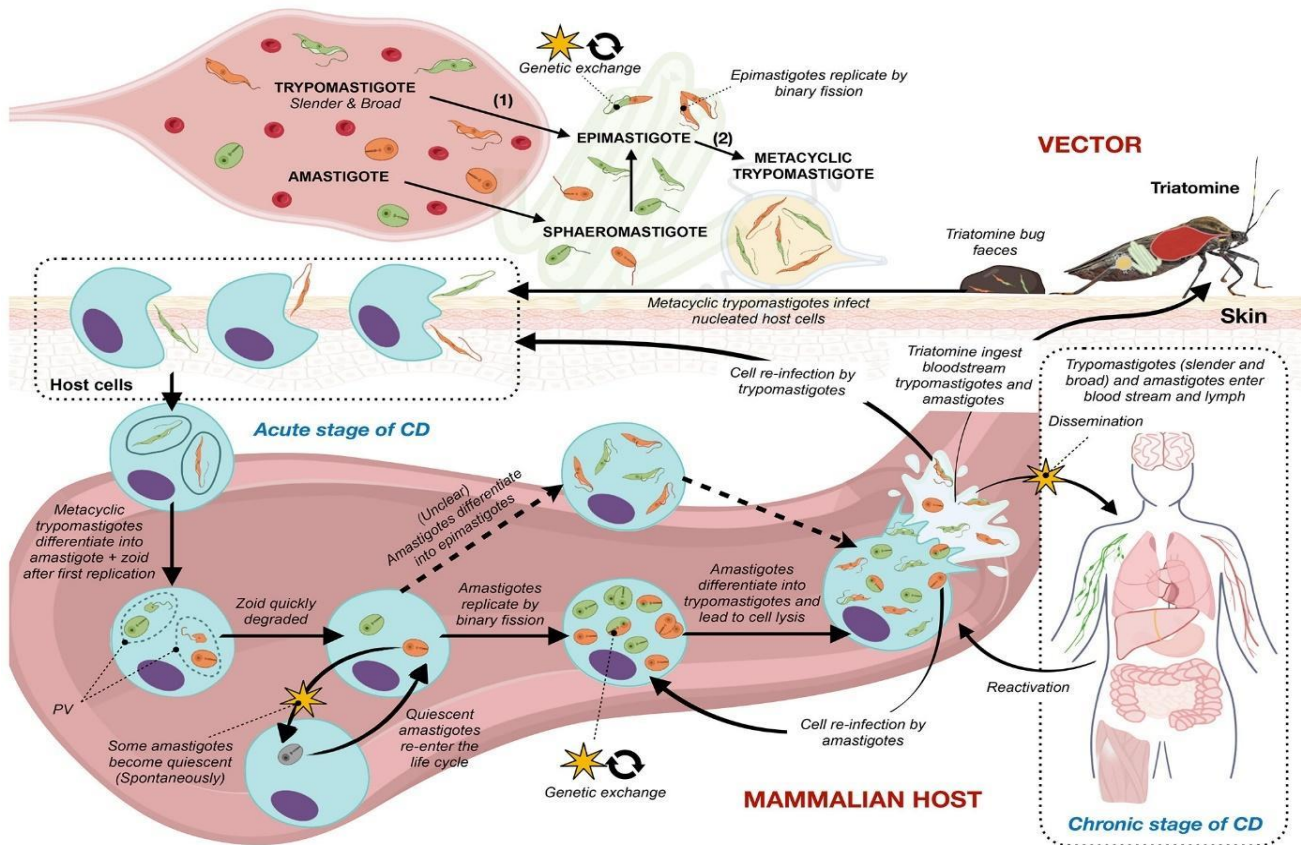


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* e principais desafios para o desenvolvimento de tratamentos eficazes para a doença de Chagas. (1) Tripomastigotas migram para o intestino médio e se diferenciam em epimastigotas. (2) Os epimastigotas migram para o intestino posterior e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Abreviaturas: CD: doença de Chagas; PV: vacúolo parasitóforo. As cores verde e laranja dos parasitas representam duas linhagens diferentes e os estágios em que ocorre a troca genética. Fonte: Martín-Escolano et al., 2022.

1.5. CLASSIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS UNIDADES DISCRETAS DE TIPAGEM DE *Trypanosoma cruzi*

Atualmente é reconhecido que a estrutura populacional de *T. cruzi* é multiclonal e com bastante diversidade genética. Desde a descoberta da doença de Chagas vários autores propuseram variadas subdivisões intraespecíficas dependente do desenvolvimento de ferramentas com maior poder de distinção (Lidani et al., 2019). Inicialmente, as diferenças entre as populações de *T. cruzi* foram propostas de acordo com as variações morfológicas propostas por Chagas (1909). Seguidamente, Nussenzweig et al. (1963) e Nussenzweig & Goble (1966) descreveram as diferenças imunológicas entre as cepas de *T. cruzi*, baseando-se na reação cruzada com o soro heterólogo de camundongos infectados com *T. cruzi* e dividiram as cepas em três grupos. Grupo A, que eram capazes de absorver os anticorpos do soro anti-A, grupo B que absorviam parte dos anticorpos do soro anti-A e grupo C que diferia do A e B.

Com isso, *T. cruzi* tornou-se modelo para epidemiologistas moleculares e geneticistas populacionais na década de 1970. Nos dias atuais este protozoário é considerado um dos agentes patogênicos mais bem estudados em termos da evolução e estrutura populacional, embora ainda não esteja bem compreendido (Avisé, 2004). Entretanto, na década de 1970 Andrade *et al.* propuseram a primeira tentativa de agrupamento da heterogeneidade das subpopulações de *T. cruzi*. Esta proposta baseava-se nos diferentes padrões de infecção observados em camundongos Swiss infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* (Andrade *et al.*, 1970).

Foram propostos três Biodemas, o Biodema I correspondia as cepas de alta virulência e a mortalidade ocorre de 10 a 12 dias pós infecção (dpi); no Biodema II eram incluídas as cepas de virulência leve e a mortalidade é observada após 20 a 25 dpi e no Biodema III a parasitemia apresentava aumento lento e nenhuma mortalidade era observada (Andrade *et al.*, 1970; Andrade e Magalhães, 1997; Jansen *et al.*, 2020). No entanto, essa proposta não era prática pois, era demorada, dependia da disponibilidade de animais de laboratório e supõe-se que os isolados sofreram pressão de seleção devido a infecção experimental (Lidani *et al.*, 2019).

Mais tarde, Andrade (1974) classificou as populações baseando-se no comportamento no hospedeiro. Correlacionando características morfológicas específicas e comportamentais a tipos específicos de *T. cruzi*. Onde o tipo I apresentava alta virulência, o tipo II (correspondente a linhagem *T. cruzi* II) apresentava uma baixa virulência, e havia uma terceira população que foi classificada como tipo III (correspondente a linhagem *T. cruzi* I).

Em 1977 Brener propôs a classificação de dois tipos polares baseados na morfologia e tropismo tecidual. Considerou um polo agressivo representado pela cepa Y e um polo benigno representado pela cepa CL. Mas, as diferenças biológicas, imunológicas, resistência a medicamentos e clínicas encontradas indicavam que o *T. cruzi* apresentava variedade complexa entre as espécies (Coura *et al.*, 1966). Brener e Andrade (1979) recorrendo à mostras recuperadas de vários hospedeiros demonstraram claramente as diferenças entre as populações de *T. cruzi*.

Miles *et al.* (1977, 1978), estudaram cepas de *T. cruzi* isoladas no estado de Bahia e Pará, no Brasil, com o objetivo de demonstrar o grau de diversidade genética entre as cepas. Graças a eletroforese enzimática demonstraram populações distintas de *T. cruzi* (zimodemas) que circulavam no ciclo doméstico e silvestre. Com isso, forneceram um bom marcador epidemiológico para doença de Chagas. Graças a esses estudos, foi possível identificar três tipos de zimodemas, Z1, Z2 e Z3. Z1 e Z3 são descritos como estando associados ao ciclo silvestre enquanto o Z2 ao ciclo doméstico.

Anos mais tarde, foi analisado um maior número de loci e isolados e graças a essa análise a diversidade dos zimodemas foi ampliada para 43. No entanto, foram outros estudos que demonstraram evidências claras que *T. cruzi* é um organismo diplóide, sem reprodução sexuada e população com estrutura clonal (Tibayrenc & Ayala, 1988; Zingales, 2011).

Enfim, devido aos avanços em ferramentas moleculares, as subpopulações de *T. cruzi* foram agrupadas em dois genótipos distintos e filogeneticamente distantes, denominados TcI e TcII que correspondem ao Z1 e Z2, respectivamente. No entanto, foram identificadas outras seis populações descritas no táxon: TcI e TcII, sendo o último subdividido o que originou outros genótipos TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIId e TcIIe (Fernandes *et al.* 1999; Llewellyn *et al.* 2009). No entanto, a reconstrução filogenética por análise comparativa baseada no DNA ribossomal (rDNA), sugeriu que as cepas de *T. cruzi* divergem a mais de 100 milhões de anos sendo que: *T. cruzi* I, é relatada como estando associada a doença em humanos em todos os países onde a doença é endêmica e a norte de amazonas; *T. cruzi* II, é relatada no cone sul dos países da América do Sul (Martín-escolano *et al.*, 2022).

Ademais, foi proposto que o ciclo doméstico de transmissão era independente do ciclo silvestre, apesar de em alguns casos aparecerem sobrepostos. Essa suposição era sustentada em dois fatores importantes, o primeiro refere que a subpopulação TcI (Z1) é a mais ubíqua por isso é a mais detectada na natureza. O segundo fator é referente a subpopulação TcII (Z2) a qual era frequentemente isolada de humanos em áreas endêmicas onde predomina a transmissão pelo *T. infestans* em ambientes domésticos (Fernandes *et al.*, 1999; Noireau *et al.*, 2009; Jansen *et al.*, 2015). A estrutura populacional do *T. cruzi* também foi analisada a partir de genealogias de sequências mitocondriais e foram identificados três clados que apresentam correlação com as DTUs: a clado A corresponde ao TcI; clado B, para cepas TcIII, TcIV, TcV e TcVI; e clade C, exclusivo para cepa TcII (Machado e Ayala, 2001). Mais recentemente, as três clade mitocondriais foram confirmados após análise de uma grande amostra de isolados (Barnabé *et al.*, 2016).

Atualmente, o *T. cruzi* é classificado em unidades discretas de tipagem (DTU), tal fato ocorreu graças a diversos estudos realizados anteriormente com base nos padrões genéticos, químicos e marcadores biológicos. Devido a esses estudos, em 2009, o comitê de especialistas, reuniu em Búzios e propôs que as cepas de *T. cruzi* deveriam ser classificadas no mínimo em seis linhagens ou DTUs (TcI-TcVI) e ainda uma sétima proposta relacionada a TcI, a qual foi denominada Tc Bat (Zingales *et al.*, 2009, 2012; Martín-escolano *et al.*, 2022; Zingales & Bartholomeu, 2021).

O termo “unidade discreta de tipagem” foi proposto para descrever conjuntos de estoques geneticamente mais similares entre si que qualquer outro estoque e que são identificáveis por marcadores moleculares comuns (Tibayrenc, 1998; Zingales & Bartholomeu, 2021). Nesta proposta, o comitê considerou os estudos anteriores que enquadravam *T. cruzi* em dois grupos distintos, com base no padrão de marcadores genéticos, bioquímicos e biológicos (Zingales et al., 2012). Posteriormente, estudos baseados em múltiplos marcadores moleculares sustentaram a classificação definitiva do Tcbat como um novo DTU (Lima et al., 2015). A nomenclatura proposta em 2009 (Zingales et al., 2009) difere da anterior pois os subgrupos da linhagem TcII constituem DTU's independentes (TcII-VI) (Lewis et al. 2011).

As linhagens TcI e TcII são consideradas puras e que evoluíram isoladamente ao longo do tempo. No entanto, a data de divergência entre TcI e TcII ainda não é clara. Porém, com base em pequenas subunidades de rDNA supõe-se que a divergência tenha ocorrido entre 88 e 37 milhões de anos atrás. E focado na análise de genes diidrofolato redutase-timidilato sintase e tripanotiona redutase entre 16 e 3 milhões de anos atrás (Briones et al., 1999; Machado e Ayala, 2001; Ribeiro et al., 2018; Zingales & Bartholomeu, 2021). Por outro lado, as linhagens TcV e TcVI são híbridos originados de TcII e TcIII como parental putativo. Porém, a evolução de TcIII e TcIV ainda não está esclarecida. Entretanto, foram propostos dois modelos que elucidam a evolução das linhagens de *T. cruzi* (Zingales & Bartholomeu, 2021).

O primeiro modelo proposto, foi o modelo de “Duas-Hibridizações”, no qual supõe-se uma hibridização ancestral entre as linhagens parentais TcI e TcII o que originou as linhagens TcIII e TcIV e um retrocruzamento mais recente de TcIII com TcII, produzindo os heterozigóticos TcV e TcVI (Westenberger et al., 2005). O segundo modelo, é denominado modelo de “Três Ancestrais”. Este modelo propõe três genótipos ancestrais TcI, TcII e TcIII. As DTUs híbridas TcV e TcVI foram originadas da troca genética entre TcII e TcIII. A origem do TcIV não foi abordada neste modelo. Evidências experimentais que apoiam um ou outro modelo são apresentadas em outro lugar (Freitas et al., 2006).

Focando na distribuição das DTU's, a linhagens TcI é a mais abundante e bem distribuída e TcII é mais encontrada no sul e centro da América do Sul mas, a real distribuição dessa linhagem ainda não está clara (Ribeiro et al., 2018). Contudo, as linhagens TcI e TcII são as amplamente distribuídas nas regiões onde a DC é endêmica conforme ilustrado na **Figura 3a** (Velásquez-Ortiz et al., 2022). Anteriormente, era descrita a ocorrência da linhagem TcI somente no ciclo silvestre. Entretanto, esta linhagem é um importante agente causador de infecções humanas na Amazônia, região dos Andes, América central e México enquanto a TcII,

TcV e TcVI são prevalentes em humanos no cone sul da América do Sul (De Oliveira et al., 2020). Em 2009 Llewelyn *et al.* demonstram que a linhagem TcI em amplamente diversa. Nesse estudo os autores demonstram que a TcI apresenta um genótipo associado ao ciclo doméstico e outro ao ciclo silvestre de transmissão.

Mais tarde, Ramiriz *et al.* (2011) reportaram a ocorrência de três genótipos da linhagem TcI, que ocorrem no ciclo doméstico, peridoméstico e silvestre. Entretanto, pouco se sabe sobre as diferenças entre eles. Com isso, foram realizados estudos posteriormente que sustentaram mais a extensa diversidade genética da linhagem TcI. Nesses estudos foi demonstrado que a TcI é dividida de acordo com o ciclo de transmissão em dois genótipos, o doméstico designado TcI_{Dom} e o silvestre TcI_{Sylv} (Ramírez & Hernández, 2018; Velásquez-Ortiz et al., 2022).

Cruz et al. (2015) reforçaram ainda mais a suposição de que a linhagem TcI possui dois genótipos distintos. Quando infectaram camundongos ICR-CD1 com 5 cepas TcI (duas domésticas, duas silvestres e uma natural mista) e observaram que a cepa doméstica apresenta elevada parasitemia e baixo nível de dano histopatológico. Por outro lado, as cepas silvestres demonstraram baixa parasitemia e elevado nível de dano histopatológico. Esses resultados demonstram claramente as diferenças entre TcI_{Dom} e TcI_{Sylv} mas este estudo foi criticado pelo fato dos autores terem realizados os ensaios em uma linhagem de camundongo.

Por isso, León et al. (2017) recorrendo a modelo murino, infectaram 126 animais das linhagens ICR-CD1, NIH and BALB/c com duas cepas TcI_{Dom} e uma cepa TcI_{Sylv}, acompanharam os animais por 60 dias. O genótipo doméstico demonstrou elevada parasitemia nos três modelos animais. Esses resultados são uma prova clara das diferenças biológicas entre os genótipos doméstico e silvestre da linhagem TcI e corroboram com os achados de Cruz e colaboradores (Ramírez & Hernández, 2018).

Em termos de distribuição nas áreas onde a DC é endêmicas, observa-se que o genótipo TcI_{Sylv} é o mais distribuído com 55,2 % de frequência, seguida pelo genótipo TcI_{Dom} que é mais observado no norte e centro da América com cerca de 43,5% e cerca de 1% para infecções mistas (Ramírez & Hernández, 2018; Velásquez-Ortiz et al., 2022). Quanto as infecções mistas, elas são observadas em alguns países localizados a norte da América do Sul, **Figura 3b** (pontos vermelhos) (Velásquez-Ortiz et al., 2022). TcII é a segunda DTU mais distribuída nas Américas. Essa linhagem inicialmente era associado aos seres humanos, pois as subpopulações dela eram provenientes de amostras de pacientes de áreas onde a DC é endêmicas e estes apresentavam sinais clínicos na maioria da vezes severos. Por isso, a TcII foi associada ao ciclo doméstico (Jansen et al., 2015, 2020). Entretanto, a linhagem TcII pode ser observada em

infecções naturais na natureza. Este genótipo é o segundo mais frequente em mamíferos selvagens infectados no Brasil, os hospedeiros naturais da linhagem TcII foram isolados de primatas e mamíferos na mata atlântica do Brasil e em mamíferos da bacia Amazônica (Lima, 2014; Ribeiro *et al.*, 2018).

A linhagem TcIII é relatada no norte da América, concretamente no México e no centro e Sul da América. Essa linhagem ocorre no ciclo doméstico, mas também é descrita no silvestre em diversos biomas envolvendo diferentes hospedeira selvagens, desde morcegos até carnívoros. A TcIV demonstra padrão de distribuição similar a de TcIII na América do Sul, no entanto essa linhagem também é observada nos EUA (**Figura 3 C e D**). Ela é mais frequente em seres humanos e é considerada a segunda linhagem causadora da DC na Venezuela (Miles *et al.*, 1981; Jansen *et al.*, 2015; Velásquez-Ortiz *et al.*, 2022). TcV e TcVI são duas DTU's híbridas similares, com distribuição similar (**Figura 3F e G**) e causadoras da DC na América central e do Sul (Zafra *et al.*, 2008; Velásquez-Ortiz *et al.*, 2022).

A distribuição das DTU's nas regiões não-endêmicas ainda não está esclarecida, tal fato está aliado aos pontos referidos no *subcapítulo 1.3*. Entretanto, Abras *et al.* (2017) realizaram a identificação de unidades discretas de tipagem de *T. cruzi* em amostras de sangue coletadas de emigrantes residentes em Barcelona, provenientes da Bolívia. A DTU mais frequente foi a TcV em todas as amostras analisadas achado que foi relacionado ao fato da TcI e TcV serem as DTU's mais comuns no ciclo doméstico na Bolívia.

Em outro estudo realizado por De Oliveira *et al.* (2020a) em imigrantes proveniente da Bolívia residentes na Barcelona, Espanha e observaram prevalência (~77%) similar de infecções pelos genótipos TcV, TcII/TcVI e TcII/TcV/TcVI. Enquanto, o TcII/TcVI prevaleceu em pacientes da Argentina (~8%), Paraguai (~4%) e Uruguai (~5%). Contudo, este foi o primeiro estudo a demonstrar a presença do genótipo TcVI no continente Europeu em pacientes Bolivianos com DC crônica e em todas as amostras analisada não foi observada a presença do genótipo TcI.

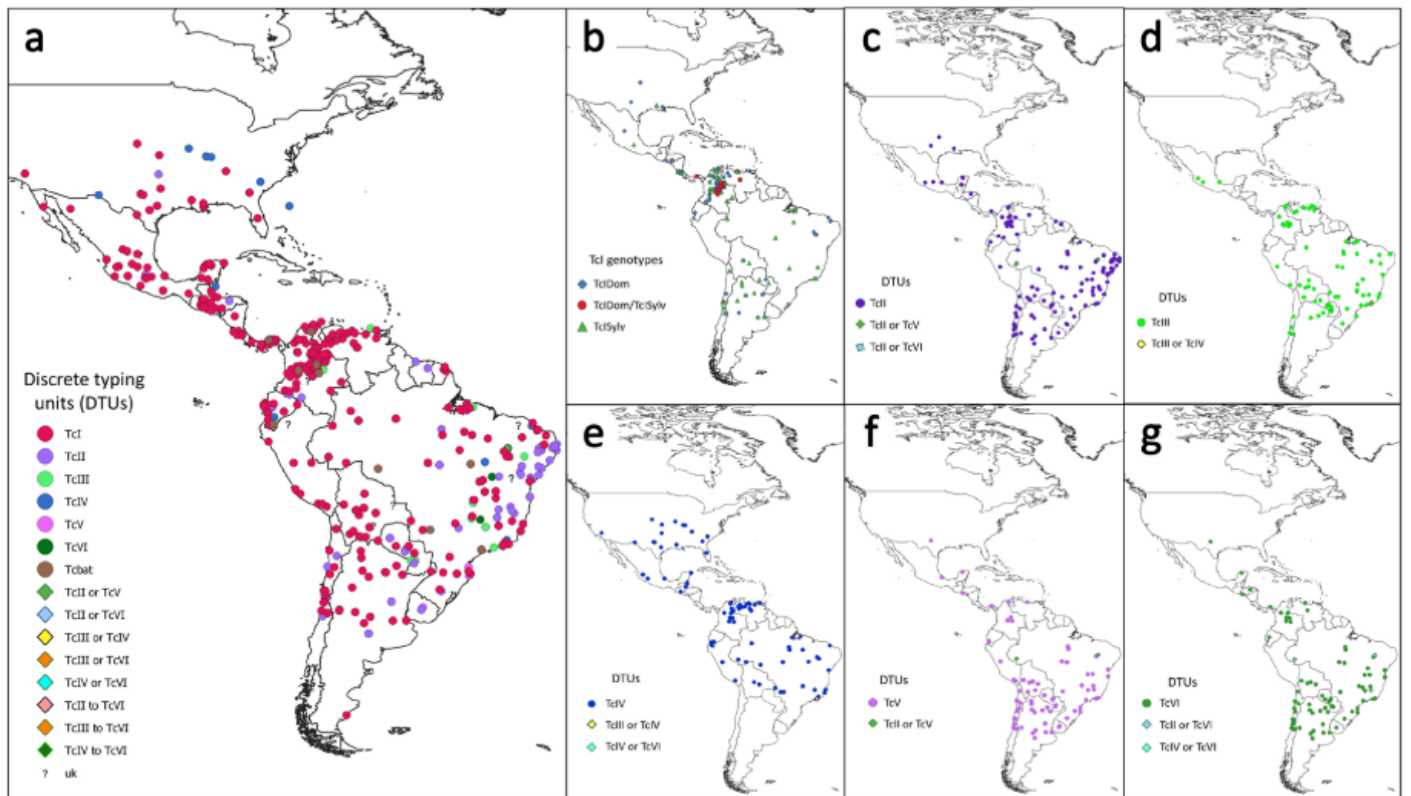


Figura 3. Distribuição das DTUs de *T. cruzi* nas Américas. (a) Mapa de consensual contendo todas as 15 categorias (indicadas na legenda), (b) Distribuição de TcI e seus genótipos, (c) TcII, (d) TcIII, (e) TcIV, (f) TcV e (g) TcVI. Fonte: Velásquez-Ortiz et al., 2022.

Quanto a distribuição das DTU no território Brasileiro, observa-se que as linhagens TcI e TcII são as mais frequentes em todos os biomas, conforme ilustrado na **Figura 4A**. Seguido por TcIII e TcIV, sendo TcV raramente encontrado. No entanto, deve se ter em conta quatro aspectos: (i) as estratégias de transmissão das DTUs menos frequentes; (ii) o fato destas DTUs serem identificadas em pontos extremamente distantes; (iii) a falta de relação entre as DTUs e os biomas; e (iv) a alta diversidade de DTUs em uma área relativamente pequena do sudeste da Mata Atlântica. A **figura 4B** mostras as infecções mistas por diferentes DTUs de *T. cruzi* ou espécies de *Trypanosoma* foram observadas em todos os biomas brasileiros. Porém, o hospedeiro geralmente associado a essas infecções mistas varia. Na Floresta Amazônica e Cerrado a infecção é associada aos morcegos, Floresta Amazônica e na Mata Atlântica os gambás, nos quatis em Pantanal, roedores caviomorfos do gênero *Thrichomys* na Caatinga, triatomíneos, principalmente *Triatoma vitticeps*, na Mata Atlântica (Jansen et al., 2020).

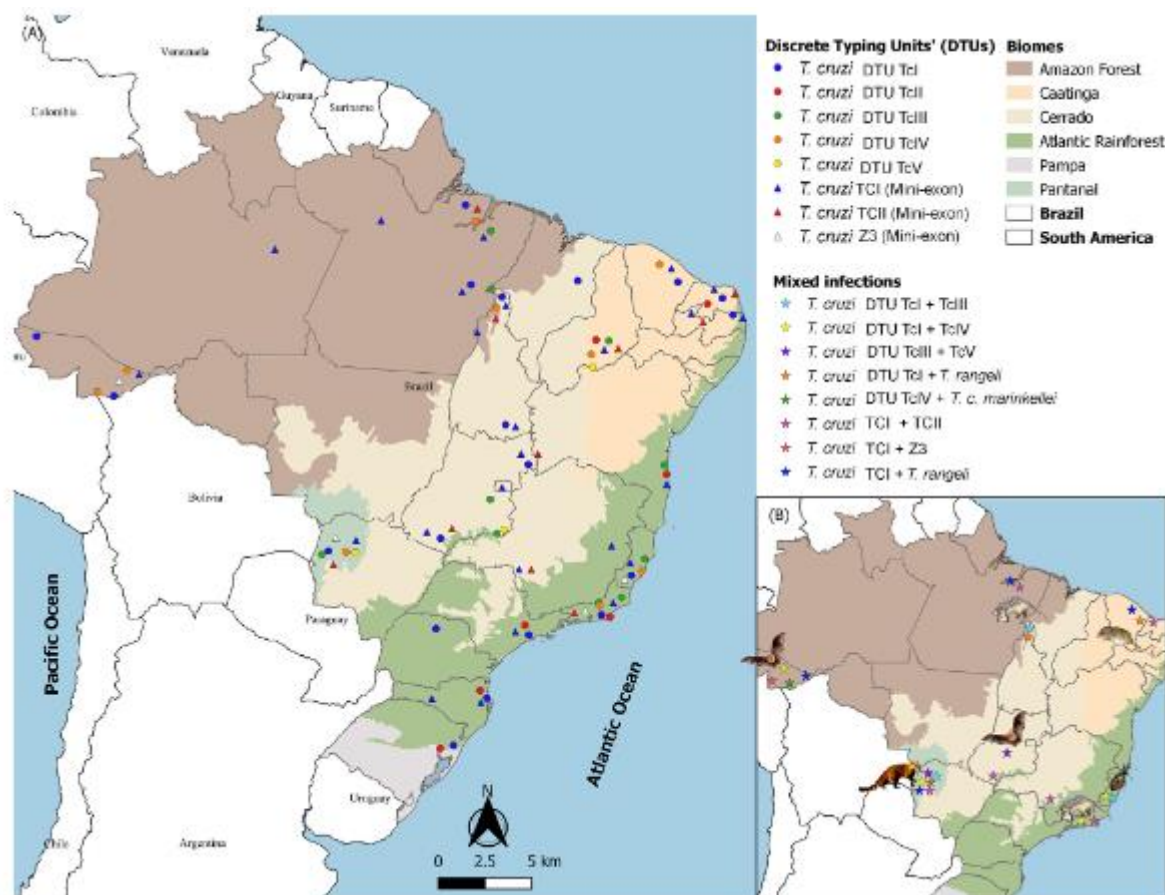


Figura 4. Distribuição das DTUs de *Trypanosoma cruzi* nos biomas Brasileiros segundo os isolados depositados na Coleção de *Trypanosoma* de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores (<http://coltryp.fiocruz.br>)(A) e as infecções mistas observadas e seus hospedeiro. Fonte: Jansen et al., 2020.

Na tentativa de entender melhor as subpopulações de *T. cruzi*, principalmente no processo de interação patógeno-hospedeiro, foram isoladas da natureza cepas deste protozoário em hospedeiros mamíferos vertebrados, constituindo as linhagens laboratoriais. A seguir serão referidas algumas cepas laboratoriais e as linhagens de DTU's as quais estão incluídas, o hospedeiro de origem do qual foram isoladas e a proveniência.

As pertencentes a DTU TcI são: Tm, isolada de *Triatoma melanocephala*, proveniente da Bahia, Brasil; Bolívia cl3 e Bolívia cl4, isoladas de *T. infestans*, provenientes de Vitichi, Bolívia; SC90 e TCC45, isolada de *Didelphis aurita*, proveniente de Santa Catarina e São Paulo, respectivamente, Brasil; G, isolada de *Didelphis marsupialis*, proveniente de Amazonas, Brasil; Sylvio X10, isolada de *Homo sapiens*, proveniente de Pará, Brasil; TCC269 isolada de *Saguinus midas*, proveniente de Amazonas, Brasil; T lenti, isolada de *Triatoma lenti*, proveniente de Bahia, Brasil (Ribeiro et al., 2018).

Na DTU TcII estão incluídas: SC96 cl3 e SC96 cl4, isoladas de *H. sapiens*, provenientes de Santa Catarina, Brasil; SI8 cl1 e SI7, isoladas de *Triatoma sordida*, provenientes de Bahia,

Brasil; FAMEMA, Y e Esmeraldo clone 3, isoladas de *H. sapiens*, provenientes de São Paulo e Bahia, respectivamente, Brasil; TCC139, isolada de *D. Aurita*, proveniente de São Paulo, Brasil; SIGR3 c11, isolada de *Felis silvestris catus*, proveniente de Bahia, Brasil; TCC2557, isolado de *Phyllostomus hastatus*, proveniente de São Paulo, Brasil (Ribeiro et al., 2018).

As cepas QMM3, QMM5 e QMM12, isoladas de *Triatoma rubrovaria*, proveniente de Rio Grande do Sul, Brazil; SI5 c11, isolada de *T. sordida*, proveniente de Bahia, Brasil; Arma13 c11, isolada de *Dasytus novemcinctus*, proveniente de Boqueron, Paraguai; TCC863, isolada de *Euphractus sexcinctus*, proveniente de Rio Grande do Norte, Brasil; MT3869 e M6241 c16, isolada de *H. sapiens*, proveniente de Amazonas e Pará, respectivamente, Brasil; MT3663, isolada de *Panstrongylus geniculatus*, proveniente de Amazonas, Brasil são incluídas na DTU TcIII. Na DTU TcIV são incluídas as cepas, Can III, TCC1441 e TCC1446, isoladas de *H. sapiens*, provenientes de Pará, Brasil; TCC206, isolada de *Nasua nasua*, proveniente de Pará, Brasil (Ribeiro et al., 2018).

As cepas Sc43 c11 e TCC186, isoladas de *T. infestans*, provenientes de Santa Cruz, Bolívia; NR c13, isoladas de *H. sapiens*, proveniente de Salvador, Chile, são incluídas na DTU TcV. A CL Brener, isoladas de *T. infestans*, provenientes do Rio Grande do Sul, Brasil, são agrupadas na DTU TcVI. Na DTU TcVI são incluídas as linhagens laboratoriais utilizadas em experimenta o são: TCC1122, isoladas de *Myotis albescens*, proveniente de São Paulo, Brasil; TCC294 e TCC1994, isoladas de *Myotis albescens*, provenientes de São Paulo, Brasil; TCC597, isoladas de *Myotis nigricans*, proveniente de Mato Grosso do Sul, Brasil (Ribeiro et al., 2018)

A cepa G e Y, cepas utilizadas no presente estudo para avalia o do impacto da proteína P21, são consideradas cepas polares. A cepa G (TcI) geralmente   usada como parasita modelo de baixa virulência pois, não causa parasitemia detectável em camundongos, sendo somente detectável por colora o histológica (Zingales *et al.* 2009; McLean et al., 2018) e com rapido crescimento *in vitro* (Rodrigues et al., 2012) A cepa Y   uma das DTU's da TcII, na literatura ela   descrita com uma cepa de crescimento rápida *in vitro* (Moraes *et al.* 2016).

1.6. FASES DA INFEC O NATURAL E EXPERIMENTAL

Conforme referido anteriormente, os aspectos relacionados ao ciclo de vida e patogênese da doença foram descritos inicialmente em 1908 (Chagas, 1909; Coura, 2013). Tal fato, permitiu diferenciar dois estágios da doença, a fase aguda e crônica. Inicialmente, observa-se no local de penetra o do parasita a presença de tripomastigotas em leucócitos, células do tecido

subcutâneo, desenvolvimento de edema intersticial, infiltração linfocítica e hiperplasia reativa de linfonodos adjacentes. Seguidamente, as formas tripomastigotas disseminam-se pelo sistema linfático e corrente sanguínea, concentrando-se principalmente nos músculos (incluindo o miocárdio) e células ganglionares. Podendo ocorrer pseudocistos característicos da doença em alguns tecidos. Estes pseudocistos são agregados intracelulares de amastigotas (Rassi et al., 2012).

Nesta fase inicial (fase aguda) os sintomas clínicos desenvolvem-se do 8º ao 10º dia após a infecção. Em casos de transfusão de sangue os sintomas manifestam-se de 20 a 40 dias. As formas tripomastigotas podem ser detectadas no sangue periférico, com pico de parasitemia 30 dias após a infecção. No entanto, a maioria dos casos são assintomáticos ou pouco sintomáticos, somente 10% dos casos desenvolvem sintomas mais específicos e uma síndrome clínica que tende a se desenvolver em semanas (Rassi et al., 2010, 2012; Suárez et al., 2022).

Os sinais clínicos que podem ser observados nesta fase incluem: febre, mal-estar, dor de cabeça, mialgia, linfadenite, hepatomegalia e esplenomegalia. Outros sintomas inespecíficos e gerais incluem a taquicardia, anorexia, vômitos e cefaléia. Estes sintomas podem cessar em 60 dias, mesmo sem a administração de fármacos específico para o tratamento da doença. Também pode ser observado a presença de edema subcutâneo e indolor no local da picada, quando o parasita penetra via mucosa conjuntival, causando o sinal Romãna (sinal patognômico homônimo, descrito por Romãna e Mazza em 1934) que consiste no edema unilateral da pálpebra e tecidos periorbitais (Barrett et al., 2003; Rassi et al., 2012; Echavarría et al., 2021).

Porém, o edema é um sinal secundário ao bloqueio dos vasos linfáticos (lesão primária) onde as formas amastigotas, se replicam para invadir o sistema reticuloendotelial. Seguidamente, a linfadenopatia regional torna-se aparente seguida de aumento do fígado e do baço que pode ser palpável no exame físico (Suárez et al., 2022).

Na transmissão vetorial os sintomas geralmente aparecem após um período de incubação de 7 a 30 dias. Entretanto, em infecções que ocorrem devido ao consumo de alimentos ou bebida contaminadas com fezes de triatomíneos contendo parasitas viáveis, o período de incubação pode ser abruptamente mais curto. Geralmente as apresentações mais graves da DC aguda são observadas nos casos relacionados à via oral devido a maior carga parasitária (Franco-Paredes et al., 2020).

Ainda sobre esta fase, observa-se uma resposta inflamatória tecidual característica e tropismo parasitário preferencial em células mesenquimais do tecido adiposo (lipochagomas). Também pode ser observada invasão e necrose de miócitos (miocardite aguda e grave) e

meningoencefalite que pode ser fatal, principalmente em hospedeiros imunocomprometidos (Suárez et al., 2022). Em alguns casos pode ser observada degeneração hialina das fibras musculares, necrose coagulativa dos miócitos envolvendo o epicárdio e pericárdio como sinais de dano imunológico mediado por células aos miócitos e ao endotélio capilar (Acquatella et al., 2018; Echeverria & Morillo, 2019; Hidron et al., 2010). Em alguns casos (5%) a sintomatologia cardíaca é a uma das maiores causas de morte. Os sinais nervosos são pouco frequentes, mas podem ocorrer sob forma de meningoencefalite em crianças abaixo de 2 anos de idade (Echavarría et al., 2021).

No entanto, cerca de 60-70% de casos da DC na fase aguda quando não tratados progridem para a forma crônica indeterminada (infecção crônica assintomática) que pode durar toda a vida, e os restantes 30%, em um intervalo de 10 a 30 anos progridem para a forma crônica sintomática que afeta o coração (20-30% de infecções), o trato gastrointestinal (5–20%) causando a síndrome megacólon e megaesôfago, mais raramente, o sistema nervoso periférico (polineuropatia sensorial, menos de 5%) ou queixas clínicas cardiodigestivas (forma mista 5-10%) (Rassi et al., 2010; Sica et al., 1995; Vago et al., 2000; Chappuis e Jackson, 2018).

A forma crônica indeterminada é considerada a apresentação clínica mais frequente da DC. O paciente chagásico nesta forma apresenta um exame físico e linhas no electrocardiograma (ECG) normais. Podem ser observados sinais gastrointestinais em alguns indivíduos assintomáticos e sorologicamente positivos. Porém, em indivíduos imunossuprimidos (em terapia imunossupressora, indivíduos portadores de HIV e transplantados) existe maior probabilidade de progressão ou recidiva da doença (Suárez et al., 2022).

No entanto, a forma crônica sintomática da DC é caracterizada por manifestações cardíacas. A cardiomiopatia Chagásica crônica (CCC) é a manifestação mais grave da doença e a mais comum. Esta forma afeta um terço dos indivíduos com diagnóstico sorológico positivo, e em estado grave, sendo a única opção de tratamento é transplante de coração (Marin-neto et al., 1999). A cardiomiopatia inclui uma combinação de fatores tais como, a carga parasitária, a linhagem do parasita e a resposta imune do hospedeiro aos estágios iniciais da doença e subsequente dano tecidual, desempenham um papel na patogênese da forma crônica (Del Puerto et al., 2010).

Esta é a forma mais comum da DC, estima-se que esteja presente em até 45% de casos de pacientes cronicamente infectados e a sintomatologia inclui tromboembolismo, anomalias de condução, arritmias e insuficiência cardíaca por cardiomiopatia dilatada (Suárez et al., 2022).

No entanto, o fenótipo da cardiomiopatia chagásica é variável. Porém, a cardiomiopatia dilatada acompanhada de anormalidades no sistema de condução é o achado mais frequente. Na qual observa-se manifestações elétricas que incluem bloqueio de ramo direito (RBBB), bloqueio fascicular anterior esquerdo (LAFB), disfunção do nó sinusal e arritmias ventriculares (Echavarría et al., 2021; Echeverria & Morillo, 2019).

Também podem ocorrer anormalidades estruturais como aneurisma apical no ventrículo esquerdo e ainda embolia secundária como resultado da formação de trombos e acidente vascular cerebral. E ainda, arritmias atriais e ventriculares que envolvem classicamente o nó sinusal. Estes sintomas na maioria dos casos ocorrem em combinação com outras manifestações cardíacas após alterações fibróticas no sistema de condução cardíaco (Hidron et al., 2010; Rassi et al., 2012; Acquatella et al., 2018; Echeverria & Morillo, 2019).

No eletrocardiograma de 12 derivações é frequentemente observado o bloqueio fascicular anterior esquerdo, bloqueio de ramo direito e alterações da onda ST-T. Também são relatados sinais como palpitações, tonturas ou síncope. De forma geral a morte súbita é maior causa de morte por DC em cerca de 55-66% dos casos e é frequentemente secundária a taquiarritmia ventricular (Rassi et al., 2001).

No entanto, a sobrevivência prolongada do paciente chagásico, na ausência de sintomas, leva a ocorrer inflamação crônica o que resultando em lesões irreversíveis no sistema de condução e nas células cardíacas. E leva ao desenvolvimento de uma miocardite difusa e progressiva, agravada pela autoimunidade secundária ao mimetismo molecular e à ativação policlonal (Acquatella et al., 2018; Echavarría et al., 2021; Echeverria & Morillo, 2019; Hidron et al., 2010).

DC crônica que afeta o trato gastrointestinal, causa as síndromes megaviscerais que são causadas pela denervação do sistema nervoso entérico que aparecem anos após a infecção aguda. O megacólon é a forma mais comum, afetando principalmente o cólon sigmóide e o reto, causando sintomas que vão desde constipação até desmotilidade grave, impactação fecal e isquemia intestinal (Meneghelli, 2001).

A síndrome megaesôfago ocorre devido a dismotilidade esofágica, como a acalasia, é uma característica clássica da DC. Os pacientes podem referir odinofagia, disfagia, refluxo tosse e regurgitação secundárias. A enteropatia chagásica é a apresentação menos comum de megavisceras (megaduodeno, megajejuno) e está invariavelmente ligada ao megaesôfago ou megacólon. Podem ocorrer síndrome dispéptica, absorção alterada e supercrescimento bacteriano (Meneghelli, 2001).

Cerca de 10% dos pacientes assintomáticos com DC crônica apresentam anormalidades gastrointestinais radiológicas. Alguns grupos recomendam estudos radiológicos baseados em contraste (enema de bário, esofagograma) mesmo para pacientes assintomáticos, enquanto outros apenas o aconselham se os sintomas estiverem presentes (Pinazo et al. 2010).

Outros estudos como manometria e endoscopia são utilizados para classificar e abordar casos que apresentam sintomas gastrointestinais. Mesmo em áreas geográficas com elevada prevalência de formas gastrointestinais da doença, a cardiomiopatia cardíaca é mais comum, sendo que as investigações relevantes para doença cardíaca devem ser sempre realizadas em simultâneo (Suárez et al., 2022).

Porém, algumas das linhagens do parasita foram associadas a manifestações clínicas específicas da doença, embora esse achado não seja consistente. A TcI em regiões ao norte da Amazônia foi associada a cardiomiopatia, a TcII, IV, VI na região central e Cone Sul do Brasil, ao megaesôfago e megacólon (Miles *et al.*, 2003; Bhattacharyya *et al.*, 2014). Em termo de virulência, é reconhecido que a TcII apresenta elevada parasitemia sistêmica (mais virulenta) em relação a TcI em modelo murino (Ragone *et al.*, 2012). Porém, em um estudo pioneiro conduzido por Deane *et al.* (1984), de longo prazo sobre a interação do *T. cruzi* com o gambá *D. aurita* demonstrou que *D. aurita* apresentou um padrão de infecção muito distinto quando infectado pela cepa Y (TcII) em comparação com o infecção causada pela cepa F (TcI) onde observaram que os gambás eliminam rapidamente a primeira infecção da circulação periférica, mantendo parasitemias detectáveis no sangue quando infectados pela última. Em outras palavras, ficou claro que os gambás diferem em seu potencial de suscetibilidade a infecção para TcI e TcII. Além disso, esses estudos demonstraram que desde tenra idade, aproximadamente 50 dias, mas ainda na bolsa marsupial, *D. aurita* é capaz de controlar a infecção por *T. cruzi* (Jansen et al., 1994, 2020).

Assim, foi observado que *D. aurita* mantém altas parasitemia na infecção por parasitas da DTU TcI, mas não por parasitas da DTU TcII, em contraste com outra espécie de marsupial didelfídeo, gambá *Philander* (*Caluromys philander*), que responde com altas parasitemias quando inoculado com DTU TcII (Legey et al., 1999; Jansen et al., 2020).

Com isso, os estudos iniciados por Deane e colaboradores, quebraram o paradigma porque mostraram que a cepa Y, considerada “agressiva”, estava longe de merecer esse adjetivo, principalmente em infecções de gambás. No entanto, quando realizados inóculos intraperitoneais da cepa Y em camundongos, neste hospedeiro, essa cepa tem se demonstrada virulenta e patogênica (Andrade et al., 1970; Andrade e Magalhães, 1997). Acrescido ao fato,

sabe-se que os micos-leões-dourados (MLGs) são capazes de manter infecções naturais pela linhagem TcII sem comprometimento clínico, bioquímico ou cardiológico. Sustentando ainda mais os achados de Deane (Monteiro R. V. et al., 2010; Lisboa et al., 2015).

Estas descobertas demonstraram e reforçaram que a virulência e patogenicidade não são atributos exclusivos do parasita. Também que a virulência não resulta necessariamente em patogenicidade. Na verdade, os gambás mantêm parasitemias elevadas e duradouras pela cepa F (DTU TcI), sendo detectáveis por hemoculturas por um longo período de tempo sem causar danos significativos (Jansen et al., 1991).

1.7. RESPOSTA IMUNOLÓGICA NATURAL E EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma cruzi*

O sistema imune é o conjunto de células e moléculas responsáveis pela imunidade. E a resposta coletiva e coordenada a entrada de substâncias estranhas é denominada resposta imune. A defesa contra microrganismos é mediada por respostas sequenciais e coordenadas denominadas imunidade inata e adaptativa, a fim de gerar memória e especificidade na resposta. O sistema imune inato responde quase imediatamente a microrganismos e células lesadas, e repetidas exposições invocam respostas imune idênticas. Os principais componentes da imunidade inata são as barreiras físicas e químicas (epitélios e agentes antimicrobianos produzidos nas superfícies epiteliais), células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dentríticas, mastócitos, células Natural Killers e outras células linfóides inatas, proteínas sanguíneas, como o sistema complemento. A resposta imune adaptativa é mediada pelos linfócitos e seus produtos. Estes linfócitos expressam diversos receptores que são capazes de reconhecer um grande número de antígenos de maneira específica. Existem duas populações de linfócitos, linfócitos B e linfócitos T (Abbas et al, 2019).

O controle da infecção por *T. cruzi* depende de ambas as imunidades inata e adquirida. Na fase aguda da DC as células da resposta imune inata estão diretamente envolvidas no combate à infecção. Nessa fase, as células fagocíticas do sistema imune inato do indivíduo infectado com *T. cruzi*, reconhem os PAMPs por meio dos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), principalmente, pelos receptores tipo Toll (TLRs) e iniciam uma sequência de eventos que irão fagocitar o parasita e iniciar a resposta imune inata (Rodrigues et al., 2012). Dessa forma a resposta imune adaptativa será ativada por meio da apresentação de antígenos do

parasita associados às moléculas de MHC de classe I e II. Essas moléculas irão interagir com os TCRs dos linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺, respectivamente (Ropert e Gazzinell, 2000).

Os principais PAMPs são as âncoras glicosilfosfatidilinositol derivadas de glicoproteínas semelhantes à mucina de *T. cruzi* (mucinas-GPI). Elas são encontradas em grandes quantidades na membrana celular dos tripanossomatídeos. A maioria das GPIs são reconhecidas por TLR2, que fica ativo após a dimerização com TLR6. Outras moléculas do parasita como as glicoinositolfosfolipídios (GIPLs) são reconhecidas pelo TLR4 (Campos et al., 2001; Almeida e Gazzinelli, 2001; Oliveira et al., 2004). A importância dos TLRs foi reconhecida através do mecanismo de resistência a *T. cruzi*, a qual foi demonstrada utilizando camundongos nocaute para a proteína adaptadora MyD88, essencial para sinalização de quase todos os TLRs. Esses camundongos, quando infectados com tripomastigotas, apresentaram alta parasitemia e mortalidade que foram associadas à baixa produção de IFN- γ e IL-12 (Gazzinelli e Denkers, 2006).

Além disso, camundongos nocautes para TLR4 apresentaram parasitemia grave, confirmando o papel do TLR4 na resistência à infecção por *T. cruzi* (Oliveira et al., 2004; 2010). Relacionado a isso, camundongos nocaute para TLR2 e TLR9 (que reconhecem o DNA do parasita) foram mais suscetíveis à infecção por *T. cruzi* além de apresentarem baixa resposta Th1 (19). No entanto, estudos anteriores demonstraram que o TLR9 desempenha um papel crucial no estabelecimento da resposta Th1, enquanto o TLR2 parece atuar como um imunorregulador na fase inicial da infecção (Cristovão-Silva et al., 2021).

Com a ativação por esses receptores, macrófagos, células dendríticas e células natural killer (NK) desencadeiam uma forte resposta inflamatória juntamente com o aumento da produção de citocinas e quimiocinas (Andrade et al., 2014). Na fase aguda há produção aumentada de citocinas inflamatórias IL-12, TNF- α e IFN- γ e das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10 (Qidwai e Khan, 2016). Os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR3 são conhecidos como marcadores imunológicos da resposta Th1, enquanto o CCR3 está associado à resposta Th2 (Qin et al., 1998). O receptor CCR5, receptor de CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5, tem duplo papel na patogênese da doença: por um lado, é extremamente importante no controle da infecção aguda, por outro lado, sua expressão exacerbada pode manter a inflamação levando ao dano ao tecido miocárdico (Oliveira et al., 2016).

Além disso, na fase crônica, foi demonstrado que pacientes com doença de Chagas também apresentavam níveis séricos mais elevados de CXCL9, CXCL10 e IL-1 β e níveis séricos mais baixos de CCL5 do que indivíduos não infectados (Araújo et al., 2020). Entretanto, outro estudo

demonstrou que pacientes crônicos que apresentavam níveis mais elevados de mRNA de CXCL9 e CXCL10 também apresentavam maiores intensidades de miocardite (Nogueira et al., 2012). No entanto, em uma estudo realizado em camundongos infectados com *T. cruzi* na fase aguda, CXCL9 e CXCL10 parecem ser importantes no controle da carga parasitária (Hardison et al., 2006). O CCR5 juntamente com receptor CCR2, demonstraram estar relacionados às diferentes manifestações clínicas da doença (Ortega Zamora et al., 2017). Com isso, é razoável afirmar que as quimiocinas desempenham papel relevante na doença de Chagas tanto na infecção inicial bem como na fase crônica da doença (Cristovão-Silva et al., 2021).

Além da resposta imune inata, a resposta imune adaptativa é extremamente relevante mesmo na fase inicial da infecção. Pesquisa de Menezes et al. (2004) mostrou miocardite relacionada à presença de linfócitos T CD4+ e CD8+ na fase aguda da doença, bem como de antígenos de *T. cruzi*. Com isso, pode se afirmar que estas células provavelmente estejam envolvidas na patologia da miocardite aguda. Os linfócitos T CD4+ e CD8+ secretam principalmente IFN- γ , principal citocina responsável pela polarização Th1 em relação a Th2. Por outro lado, os linfócitos T CD8+ são observados em processos relacionados ao controle de parasitas na infecção aguda, durante a progressão da doença e também na fase crônica da patologia, estando igualmente associados a uma possível ausência de atividade que auxilia no estabelecimento a doença (Costa et al., 2000; Albareda et al., 2006; Dutra et al., 2000). Além dos linfócitos T, linfócitos B e a produção de anticorpos também é relevante na resposta ao *T. cruzi* (Tarleton, 2001).

O controle da doença também envolve anticorpos, os linfócitos T CD8+ (citotóxicos) e linfócitos T CD4+ (helper, tipo Th1) produzindo altos níveis de IFN- γ (Tarleton, 2001). Estudos em modelos experimentais agudos da doença demonstraram o papel de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF e IL-6 na resistência à infecção por *T. cruzi* (Machado, 2000; Gao e Pereir, 2002). Pelo contrário, o perfil Th2 está relacionado com a suscetibilidade à doença e a principal citocina envolvida é a IL-4 (Hiyama et al., 2001).

A fase aguda dura 2–3 meses e termina quando o sistema imunológico consegue controlar a parasitemia e o nível de parasitas nos tecidos. Apesar de toda a resposta imunológica desenvolvida para combater o parasita, muitos pacientes evoluem para a forma crônica da doença. Alguns dos fatores envolvidos nesta evolução são a evasão do *T. cruzi* ao sistema imunológico, à cepa envolvida na infecção inicial e ao sistema imunológico do hospedeiro (Nagajyothi et al., 2012; Rodrigues et al., 2010).

Na fase crônica da doença é sabido que existe um perfil Th1 de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6, IL-9, IL-12) com baixo nível de perfil Th2 de citocinas (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) em pacientes com sinais cardíacos e digestivos. Por outro lado, o oposto é observado na forma indeterminada de Chagas, sugerindo que o equilíbrio dessas citocinas poderia desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento da doença (Cristovão-Silva et al., 2021).

TNF e IFN- γ são as duas das principais citocinas do perfil pró-inflamatório, que estão diretamente envolvidas na patologia cardíaca crônica da DC em modelos humanos e experimentais (Criado et al., 2012; Pereira et al., 2014; Torzewski et al., 2012). Devido à importância das citocinas no desenvolvimento da doença, algumas delas, como TGF- β , IL-1 β e TNF, têm sido propostas como biomarcadores de fibrose miocárdica (Chaves et al., 2019). Por outro lado, pacientes com forma cardíaca da doença produzem níveis mais elevados de IFN- γ e IL-6, enquanto pacientes indeterminados apresentaram níveis mais elevados de IL-10, (Sousa et al., 2014, Chevillard et al., 2018).

Corroborando com esses estudos, Gómez-Olarte et al. (2019) descobriram que pacientes com a forma cardíaca da doença apresentam quantidade aumentada de inflamação monócitos e produção de IL-6 em comparação com indivíduos assintomáticos. Assim, a resposta imune tipo 1, embora seja importante para conter a replicação do parasita durante a fase aguda, como já descrito, também pode estar envolvida no desenvolvimento de doença cardíaca. Na forma cardíaca da doença, também foi visto que há menor número de células Th17 circulantes em relação à forma indeterminada e aos pacientes não infectados (Magalhães et al., 2013). Um estudo recente do modelo experimental da doença mostrou que as células Th17 são mais protetoras contra a infecção pelo *T. cruzi* do que as células Th1, além de mostrar que essas células podem atuar tanto na imunidade extracelular quanto na intracelular (Cai et al., 2019). Entretanto, não se sabe o que leva ao aumento do perfil antiinflamatório observado na forma indeterminada em relação a um pró-inflamatório observado na forma cardíaca. Propõe-se que este achado pode depender de características genéticas do hospedeiro e alterações no sistema imunológico dependentes da idade (Cristovão-Silva et al., 2021).

Em relação à forma indeterminada, há aumento da expressão de citocinas e fatores de transcrição relacionados aos perfis Th2, Th9, Th22 e Treg, associados à redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF (Guedes et al., 2016; Souza et al., 2017).

Além disso, outros estudos mostram correlação entre a produção de citocinas inflamatórias por células T CD4+ e monócitos de pacientes com a forma cardíaca e a produção de IL-10 pelas mesmas células de pacientes assintomáticos (Souza et al., 2004, 2007). Além dessas, as células

Treg também estão envolvidas na produção de IL-10 e são encontradas principalmente em pacientes com a forma indeterminada da doença, mostrando a importância destas células na regulação da resposta imunológica nesses pacientes (Araújo et al., 2012). Devido a isso, foi sugerido que um tratamento para a doença de Chagas deveria melhorar as células Treg (González et al., 2015). Além disso, um estudo com pacientes com a forma cardíaca mostrou maior produção de IL-10 e IL-17 na forma mais leve da doença e que diminuição da função das células T CD4+CD25+ e menores níveis de IL-17 estão associados à forma mais grave da doença (Guedes et al., 2012).

Além do protozoário conseguir modular e evadir a resposta imune por si, outro fator que está envolvido na resposta imunológica é a cepa do parasita. Um estudo com duas cepas de dois DTUs diferentes (TcI e TcII) na infecção aguda mostraram que a cepa Col cl1.7, pertencente ao TcI, levou a uma maior ativação de monócitos e produção de IL-10, enquanto a cepa Y, pertencente ao TcII, ativa menos monócitos, porém, causa maior produção de citocinas pró-inflamatórias por células mononucleares periféricas (Magalhães et al., 2015).

1.8. TRATAMENTO CONTRA A DOENÇA DE CHAGAS E DESAFIOS

Após a descoberta da DC, foram realizados testes de alguns compostos para tratamento da doença (Rodrigues Coura & De Castro, 2002). Os primeiros compostos experimentalmente testados no tratamento da DC foram o atoxil (arsênico), a fucsina (corante rosanilina), o tártaro emético (ou tartarato de antimônio e potássio, um antimonial pentavalente) e o cloreto de mercúrio, no entanto, nenhum demonstrou resultado efetivo (Mayer e Rocha Lima, 1912, 1914). Em 1953 foi descoberto que o corante cristal violeta (também conhecido como Violeta de Genciana) é tóxico para *T. cruzi* em preservações de sangue. Desde então, o corante tem sido frequentemente empregado em bancos de sangue em áreas endêmicas para a DC a fim de eliminar o parasita do sangue utilizado em transfusões (Nussenzweig et al., 1953).

Na mesma senda, Packchanian (1952, 1957) descobriu uma nova e promissora linha de medicamentos potenciais no combate a *T. cruzi* com nitrofuranos que levaram a obtenção de seu derivado a nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona). A nitrofurazona (derivado de nitrofuranos) demonstrou-se efetiva contra *T. cruzi* em cerca de 95,4% quando administrado por via oral durante 53 dias consecutivos na dose de 100 mg/kg/dia em camundongos infectados experimentalmente com *T. cruzi* (Brener 1961). Entretanto, os trabalhos pioneiros realizados no tratamento da DC aguda com nitrofurano foram realizados por Ferreira (1961, 1962) e

Ferreira et al. (1963). Eles obtiveram “bons resultados clínicos” com poucos efeitos colaterais, mas o xenodiagnóstico tornou-se positivo em cinco casos após o tratamento.

Com isso, Coura et al. (1961, 1962) trataram 14 pacientes com DC na fase crônica com o mesmo fármaco, mas em esquemas de longa duração. Porém, os primeiros quatro (4) pacientes que receberam doses progressivas de 10 a 30 mg/kg/dia tiveram efeitos colaterais importantes que levaram a suspensão do teste, devido a polineuropatia sensitiva grave. Porém, quando reduziram a dose para 10 mg/kg/dia administrando-a por via parenteral e associada ao complexo B, observaram que cinco (5) pacientes toleraram o tratamento por 60 dias, apesar dos efeitos colaterais (anorexia, perda de peso, parestesia e polineuropatia sensitiva). Cançado et al. (1964) também trataram cinco pacientes crônicos com 10 mg/kg/dia de nitrofurazona durante 10 a 34 dias, mas os cinco pacientes foram considerados falha terapêutica e o tratamento foi suspenso devido a polineurite. Até 1962, foram testados outros quimioterápicos no tratamento da DC entre eles destacam-se os derivados de quinoleína, vários antimaláricos, arsenobenzoles e outros arsenicais, fenantridinas, sais de ouro, bismuto, cobre e estanho, iodeto de sódio, aminopterina, ácido para-amino salicílico, ácido nicotínico hidrazida, anti-histamínicos, sulfonamidas, ACTH (hormônio adenocorticotrópico), cortisona, derivados de estilomicina, anfotericina B, mais de 30 antibióticos e alguns nitrofuranos (Coura & Silva 1961; Brener 1968; Cançado 1968; Steverding, 2010).

Diante disso, entre 1912 a 1962 foram realizados experimentos *in vitro* e *in vivo*, testando de forma meticulosa diversos medicamentos contra *T. cruzi*. Tendo sido registrados 27 compostos e mais de 30 antibióticos (bisquinaldina Bayer 7602, o sulfato de fenatridina carbídio, aminoquinolinas [pentaquina, isopentaquina e primaquina], arsenicais trivalentes, aminoglicosídeo de estilomicina, nitrofuranos e antibióticos) com efeito supressor sobre a parasitemia, mas sem efeito curativo contra *T. cruzi* (Brener, 1968).

Em trabalhos subsequentes, Cançado e colaboradores (Cançado et al., 1973, Cançado 1981) revisaram os resultados de ensaios terapêuticos no período de 1936 a 1965. Com isso, propuseram critérios básicos para avaliação do tratamento específico, que foram posteriormente atualizados por 15 especialistas da América Latina (OPAS /OMS, 1998).

De acordo com esses critérios e seguindo as exigências da Organização Mundial da Saúde (OMS), o medicamento ideal para o tratamento da DC deveria: (1) apresentar cura parasitológica para casos agudos e crônicos; (2) ser eficaz em doses únicas ou em poucas doses; (3) ser acessível aos pacientes, ou seja, de baixo custo; (4) demonstrar ausência de efeitos

colaterais ou teratogênicos; (5) não ser necessária a internação do paciente para tratamento; (6) não induzir resistência do protozoário ao medicamento (Rodrigues Coura & De Castro, 2002).

Em 1960, a Bayer Company desenvolveu o Nifurtimox (Nif) conhecido como 5-nitrofurano (4-(5-nitro-furilidenoamina)-tetra-hidro-4-4-1,4-tiazina-1-1-dioxido, um derivado do nitrofurano, comercialmente conhecido como Lampit. A atividade tripanocida deste fármaco foi descoberta empiricamente e desde 1967 é utilizado no tratamento da DC. Entretanto, o seu modo de ação, na época, ainda não era claramente conhecido. Acreditava-se que, o modo de ação provavelmente estava relacionado com a geração de espécies reativas de oxigênio que danificam componentes celulares como DNA, lipídios de membrana e proteínas (Docampo et al., 1981). O nifurtimox foi o ativo derivado de 5-nitrofurfurilideno mais testado experimentalmente (Bock et al. 1969). No ano de 1966, Hoffmann-La Roche introduziu o benznidazol (Bz) conhecido como 2-nitroimidazol (N-benzil-2-nitroimidazolacetamida) e comercializado com o nome de Rochagan no Brasil (Radanil na Argentina), para o tratamento da doença de Chagas (Rodrigues Coura & De Castro, 2002; Steverding, 2014). O benznidazol, em experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstrou alta atividade contra *T. cruzi* (Richle 1973) Entretanto, somente em 1970 a Bayer colocou o nifurtimox no mercado, como medicamento antichagásico (Rodrigues Coura & De Castro, 2002). No entanto, em 1997, a produção foi suspensa devido à baixa procura, mas no ano de 2000 foi retomada, pois o composto tornou-se parte de uma nova terapia combinada para o tratamento da tripanossomíase Africana (doença do sono), causada pelo *Trypanosma brucei* (Steverding, 2010).

Contudo, até os dias atuais, o benznidazol e nifurtimox (fármacos nitroheterocíclicos) são os fármacos de eleição utilizados no tratamento da DC. Na fase aguda e casos congênitos recomenda-se a administração de 8 a 10 mg/kg/dia de Nif ou 5 a 7,5 mg/kg/dia de Bz durante 30 a 60 dias consecutivos, e divididos em duas ou três doses diárias. Pacientes com menos de 40 kg podem tomar até 12 mg/kg/dia de Nif e até 7,5 mg/kg/dia de Bz durante 30 a 60 dias (OPAS/OMS 1998).

Para infecção crônica recente (crianças menores de 12 anos) ou indivíduos infectados nos últimos 10 anos, o tratamento deve ser feito com 8 mg/kg/dia de Nif ou 5 mg/kg/dia de Bz durante 30 a 60 dias. Também é reconhecido que as crianças são mais tolerantes ao nifurtimox do que o benznidazol (García-Huertas & Cardona-Castro, 2021). No caso de infecção acidental o tratamento deve ser iniciado imediatamente e durar apenas 10 a 15 dias consecutivos (Rodrigues Coura & De Castro, 2002; Rassi et al., 2012).

Em casos de infecções crônicas tardias sem manifestação clínica ou com manifestações cardíacas ou digestivas leves o tratamento deve ser realizado durante 60 a 90 dias, de acordo com a tolerância aos medicamentos, visando prevenir ou reduzir a evolução da doença de Chagas para formas mais graves (Rodrigues Coura & De Castro, 2002). O benznidazol e nifurtimox, inicialmente eram administrados principalmente para o tratamento de casos agudos da DC por serem considerados menos eficazes na fase crônica (Rodrigues Coura & De Castro, 2002).

Entretanto, atualmente é sabido que esses fármacos são eficazes somente na fase aguda ou no estágio inicial da infecção e ainda que podem causar efeitos adversos durante o tratamento. Entre os efeitos adversos destaca-se a anorexia, náusea, vômito, dor de cabeça, depressão do sistema nervoso central, convulsões, vertigem, parestesia, polineuropatias periféricas e dermatite. Devido a estes efeitos adversos cerca de 10-30% dos pacientes desistem do tratamento (Coura, 2009). Outro fator que dificulta o tratamento da DC e que é outra causa de falha no tratamento, é a resistência de diferentes cepas de parasitas aos fármacos de eleição supracitados (Filardi e Benner, 1987). Um dos estudos que sustenta tal hipótese é a análise da sensibilidade ao benznidazol realizada para as cepas colombianas de *T. cruzi*, esta revelou que 36% das cepas eram sensíveis, 48% moderadamente sensíveis e 16% resistentes ao fármaco (Mejía-Jaramillo et al., 2012).

Também foi observada variabilidade nas porcentagens de cura dos pacientes na fase aguda de acordo com a área geográfica, com 81% na Argentina e 30-50% no Brasil (Ferreira, 1976). Além disso, em um estudo recente, foi identificada uma forma dormente do parasita *T. cruzi*, uma forma não reproduzível, que permite que a infecção persista após o tratamento com benznidazol por até 30 dias, e isso poderia explicar por que o tratamento frequentemente não consegue curar a doença de Chagas (Sánchez-Valdéz et al., 2018). Sendo esta forma dormente do parasita um dos principais pontos terapêuticos a serem compreendidos atualmente conforme ilustrado na **Figura 2** (Martín-escolano et al., 2022).

Apesar dos avanços alcançados na compreensão do tratamento da DC, ainda hoje, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação desses fármacos nitroheterocíclicos. No entanto, acredita-se que o nifurtimox e o benznidazol atuam como pró-fármacos e ambos são ativados no parasita por uma nitrorredutase tipo I dependente de NADH mitocondrial (Wilkinson et al., 2008; Mejia et al., 2012). O grupo nitro de ambos os fármacos é reduzido a um grupo amino, com a formação de vários radicais livres intermediários e metabólitos eletrofílicos. A redução do benznidazol

resulta na geração do metabólito citotóxico glioxal, que forma adutos⁴ com a guanosina e evita a formação de novas cadeias de DNA (Hall & Wilkinson, 2012). A redução do nifurtimox leva à produção de uma nitrila insaturada de cadeia aberta que pode reagir com muitos componentes celulares e ser tóxica para o parasita (Hall & Wilkinson, 2011).

Quanto aos efeitos citotóxicos e genotóxicos associados aos fármacos, supõe-se que estejam relacionados às estruturas químicas dos fármacos, dos quais resulta a libertação de radicais eletrofílicos durante a nitro-redução enzimática. Entre os radicais livres identificados são incluídos o nitro ânion, H, $\frac{1}{2}$ O₂ e peróxido de hidrogênio. A redução do grupo nitro altera o número de elétrons no orbital externo, aumentando assim o potencial mutagênico porque os radicais livres se ligam às fitas duplas do DNA, formando adutos. No entanto, a toxicidade do fármaco não afeta somente o parasita, bem como as células do organismo humano (Diaz de Toranzo et al., 1988; Gorla et al., 1988, 1989; Docampo e Moreno, 1984; Knox et al., 1981; Sera et al., 1982).

Por isso, o uso de nitroderivados no tratamento da DC aguda teve sucesso limitado. Entretanto, os médicos têm administrado esses medicamentos com moderação porque eles não eliminam as infecções por *T. cruzi* em cerca de 83,5% dos casos agudos. Além disso, uma indicação indireta da persistência do parasita é detectada por testes imunológicos (positivos) após o tratamento. Essas observações explicam por que é necessário ter cautela antes do uso desses fármacos, além de relatos que mostram que o uso de nitroderivados antitripanossômicos não interrompem a progressão da DC em pacientes tratados (Lauria-Peris et al., 2000; Teixeira et al., 2006). Face a esses fatos, é importante o estudo de novos alvos terapêuticos no tratamento da DC. Pois, a identificação de alvos terapêuticos poderia reduzir significativamente os efeitos colaterais dos medicamentos e melhorar o tratamento da DC.

De acordo com a Unidade de Descoberta de Medicamentos da Universidade de Dundee os critérios utilizados para avaliar alvos para doenças tropicais negligenciadas (DTN) incluem, evidência genética e química de que o alvo é essencial para o crescimento ou sobrevivência; um sítio ativo do fármaco, que é a probabilidade de modular um alvo proteico com um pequeno composto semelhante a um fármaco; que não exista homólogo humano ou que quaisquer homólogos humanos sejam não essenciais, a fim de reduzir a toxicidade; e que o alvo não possua isoformas (formas diferentes de uma proteína produzidas por genes diferentes ou pelo mesmo gene) conhecidas dentro da mesma espécie, a fim de reduzir a ocorrência de resistência

⁴ A formação de aduto de DNA representa uma ligação covalente química direta entre uma das bases do DNA e um produto químico (Snodgrass, 2010).

(Wyatt et al., 2011). No entanto, a identificação de alvos moleculares é um desafio devido ao elevado investimento de tempo e dinheiro sem garantia de sucesso na fase de validação de potenciais candidatos (Garcia-Huertas e Cardona-Castro, 2021). Tradicionalmente, a descoberta e uso de medicamentos era baseada na filosofia “um alvo – um medicamento”, o que permitiu o desenvolvimento de medicamentos bem-sucedidos que são seletivos para um único alvo (Bolognesi, 2013).

Entretanto, a descoberta de medicamentos multialvos é uma estratégia que se tornou cada vez mais importante. Esta abordagem centra-se na identificação de moléculas que interagem com mais de um alvo, a fim de aumentar o sucesso dos tratamentos, reduzir os efeitos adversos, a toxicidade e evitar a resistência medicamentosa (Jenwitheesuk et al., 2008; Kumar et al., 2014). Assim, identificar ou desenvolver um medicamento multialvo poderia contribuir enormemente para melhorar o tratamento da DC (Jenwitheesuk et al., 2008; Kumar et al., 2014; Garcia-Huertas e Cardona-Castro, 2021).

Nesse contexto, uma das principais enzimas que vem sendo estudada como alvos terapêuticos para *T. cruzi* é a esterol 14 α -desmetilase (CYP51). Ela é a mais estudada detalhadamente da via do ergosterol. O ergosterol é o principal componente esterol de parasita, necessário para a manutenção da integridade das membranas celulares e precursor metabólico de algumas moléculas sinalizadoras (Apt et al., 2013; Garcia-Huertas e Cardona-Castro, 2021).

A CYP51 utiliza lanosterol como substrato para produzir zimosterol, que é o precursor do ergosterol. No entanto, a maioria dos estudos realizados foram focados na inibição da CYP51, e nesses estudos foram observados resultados promissores em modelo *in vitro* murino, mas insatisfatórios em ensaios clínicos (Apt et al., 2013; Garcia-Huertas e Cardona-Castro, 2021). Outros alvos terapêuticos estudados são as superóxidos dismutase (SODs), um grupo de metaloenzimas com um papel antioxidante vital, pois eliminam os radicais superóxido por dismutação em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (McCord & Fridovich, 1988). Elas são classificadas em quatro (4) tipos de isoformas baseando-se na sua seletividade metálica: ferro (Fe-SOD), cobre/zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD) e níquel (Ni-SOD) (Miller, 2004).

No entanto, os alvos mais estudados são do sistema antioxidante do parasita com a tripanotiona redutase e superóxido dismutase de ferro (Fe-SOD). A tripanotiona redutase é uma flavoenzima dependente de NADPH (presente nos tripanosomatídeos) que participa da proteção celular contra o estresse oxidativo das células parasitárias, da manutenção do tiol redox e da defesa contra xenobióticos, entre outros. Esta enzima mantém o ambiente intracelular em

equilíbrio, reduzindo o dissulfeto de tripanotiona (TS₂) a tripanotiona (T(SH)₂) que, por sua vez, induz uma sequência de eventos que culminam na neutralização de espécies reativas de oxigênio (Beltran-Hortelano et al., 2017; Fairlamb & Cerami, 2003). Uma vez que a tripanotiona redutase não é expressada em hospedeiros vertebrados, esta enzima representa um alvo molecular potencial para o desenho racional de medicamentos. Já existem alguns inibidores da tripanotiona redutase, mas para atingir a atividade desejada, deve ser alcançada uma inibição de mais de 90% para afetar a viabilidade do parasita, o que explica a fraca eficácia demonstrada pelos inibidores da tripanotiona redutase *in vivo* (Soeiro et al. 2009).

Quanto a Fe-SOD, ela foi encontrada em tripanosomatídeos como *T. cruzi*, outros protozoários, procariontes e cloroplastos de plantas e algas. Enquanto a Cu / Zn-SOD e Mn-SOD foi encontrada em humanos e outros hospedeiros mamíferos (Dufernez et al. 2006). A ausência de Fe-SOD em humanos torna esta enzima um alvo essencial de estudo para o desenvolvimento de medicamentos antichagásicos, mas, um fato que deve ser considerado é que as Fe-SODs estão intimamente relacionados com a Mn-SOD de mamíferos (Beltran-Hortelano et al., 2017).

A cruzipaína e a trans-sialidase, enzimas envolvidas na invasão celular e na evasão da resposta imune, têm sido amplamente estudadas como alvos terapêuticos promissores. A cruzipaína, a principal cisteína peptidase de *T. cruzi*, é expressa nos quatro estágios principais do parasita e está presente nas organelas relacionadas aos lisossomos (Cazzulo et al., 2001). Esta enzima é encontrada no sistema endossomal-lisossomal das formas epimastigota (especialmente em reservossomos), amastigota e tripomastigota e está amplamente presente na superfície de epimastigotas e amastigotas (Souto-Padrón et al., 1990). Ela está envolvida na nutrição do parasita, na invasão de células de mamíferos, na evasão da resposta imune do hospedeiro e nas etapas de diferenciação do ciclo de vida do parasita (Alvarez et al., 2012). Os inibidores da cruzipaína matam eficientemente o parasita em cultura celular e inibem a invasão e replicação em células de mamíferos (Cazzulo et al., 2001).

Além disso, a cruzipaína também é estudada como vacina profilática, e tem demonstrado resultados promissores associados à redução da parasitemia na fase aguda e à diminuição do dano tecidual na fase crônica da infecção. Assim, a cruzipaína é um importante fator de virulência e um alvo quimioterápico com excelente validação pré-clínica (Cerny et al., 2020; Garcia-Huertas e Cardona-Castro, 2021).

Outro potencial alvo potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos é a proteína trans-sialidase. Esta enzima é uma sialidase modificada, ausentes no hospedeiro

mamífero. No entanto, *T. cruzi* necessita de ácido siálico para sobreviver na célula de mamífero, porém, é incapaz de realizar a síntese de novo ácido siálico. Para sobreviver na célula hospedeira o parasita transfere o monossacarídeo dos sialil-glicoconjugados do hospedeiro para moléculas aceitadoras terminais de β -galactose localizadas em sua superfície. E a enzima responsável por essa atividade enzimática é a trans-sialidase (Schenkman et al., 1991; Colli, 1993; Frasch, 2000).

A trans-sialidase tem sido considerada um importante fator de virulência, seja por sua capacidade de diminuir a imunidade da célula hospedeira ou por mediar a interação entre o parasita e as células hospedeiras. Com isso, nos últimos anos foram identificados muitos inibidores potenciais da trans-sialidase. No entanto, devido à falta de especificidade para a enzima do parasita, muitos ainda não foram testados em células de tecidos cultivados ou em modelos animais (Freire-de-Lima et al., 2015; Garcia-Huertas e Cardona-Castro, 2021).

E por fim, outros potenciais pontos terapêuticos são a via de salvamento das purinas, a síntese de nucleotídeos e o sistema ubiquitina-proteassoma. Estas vias são essenciais para o parasita. Em mamíferos, os nucleotídeos são sintetizados de novo e também recuperados de bases purinas recicladas. No entanto, tripanosomatídeos como *T. cruzi* não possuem a maquinaria metabólica para produzir nucleotídeos de purina e dependem de seu hospedeiro para obter purina pré-formada (Kouni, 2003; Duschak, 2016).

Assim, devem resgatar as purinas do seu hospedeiro e desenvolveram padrões para transportar, internalizar e metabolizar os constituintes dos ácidos nucleicos e do ATP. A natureza obrigatória do resgate de purinas oferece outra fonte de alvos potenciais para a descoberta de medicamentos. Da mesma forma, o sistema ubiquitina-proteassoma é um alvo potencial em *T. cruzi*. É um mecanismo eucariótico essencial que regula diferentes processos celulares essenciais, incluindo progressão do ciclo celular, controle transcricional, reparo de DNA, autofagia, tráfego de proteínas e remoção de proteínas mal dobradas, danificadas ou antigas (Bijlmakers, 2020).

Por isso, é necessário compreender melhor esses pontos terapêuticos ou explorar outros pontos da interação de *T. cruzi* com hospedeiro a fim de identificar e desenvolver outras formas terapêuticas com baixo impacto no hospedeiro (efeito adverso) e eficiente na eliminação de *T. cruzi*. No subcapítulo 1.8 será abordada a interação de *T. cruzi* com células hospedeira de experimentos realizados *in vitro* dando mais foco a linhagens de células de mamíferos vertebrado.

1.9. INTERAÇÃO DE *Typanosoma cruzi* COM HOSPEDEIRO VERTEBRADO

O termo “interação hospedeiro-patógeno” refere-se a forma como um patógeno (vírus, bactéria, príon, protozoário, fungos e viróide) interage com o seu hospedeiro. Patógenos são agentes infecciosos que causam doenças ao organismo do hospedeiro, quando o sistema imunológico falha. Frequentemente, os patógenos se adaptam às mudanças e encontram formas alternativas de sobreviver e infectar o hospedeiro. Nesse sentido, o estudo das interações hospedeiro-patógeno ajuda a entender a forma como os patógenos funcionam, como o seu ponto de entrada no hospedeiro é facilitado através das barreiras biológicas e como eles sobrevivem dentro de um hospedeiro que está frequentemente sob tratamento ou imunizado contra o mesmo patógeno. Essas interações hospedeiro-patógeno podem ser descritas à nível populacional, refere-se a infecções virais em uma população humana; à nível do organismo, refere-se a patógenos que infectam o hospedeiro ou nível molecular, refere-se a ligação da proteína do patógeno a um receptor em uma célula humana (Sen et al., 2016).

Neste subcapítulo descreveremos a interação patógeno-hospedeiro de *Trypanosoma cruzi* a nível molecular. Conforme referido anteriormente quando abordamos o ciclo de vida de *T. cruzi* (subcapítulo 1.3) após ocorrer a transmissão deste patógeno ao hospedeiro vertebrado (**Figura 2**), ele interage com as células do hospedeiro vertebrado. Essa interação patógeno-hospedeiro pode ser dividida em três fases: adesão e reconhecimento, sinalização e invasão (De Souza *et al.*, 2010)

1.9.1. Mecanismo de invasão, diferenciação e eclosão de *Trypanosoma cruzi*

Durante a invasão, *T. cruzi* sequestra as funções celulares do hospedeiro com o propósito de estabelecer um nicho replicativo. Várias vias têm sido associadas a invasão da célula hospedeira, culminando na biogênese do vacúolo endocítico conhecido como vacúolo parasitóforo (VP ou TcPV) (Barrias et al., 2013; Batista et al., 2020). Dentro do TcPV, as tripomastigotas iniciam a diferenciação em amastigotas e mesmo durante a fragmentação da membrana. A aquisição de marcadores lisossomais pelo TcPV durante o processo de internalização mostrou-se essencial para a retenção intracelular do parasita e o estabelecimento de uma infecção bem-sucedida (Andrade e Andrews, 2004).

No entanto, de forma genérica, a invasão da célula hospedeira por *T. cruzi* pode ser dividida em quatro etapas principais: 1) reconhecimento e adesão da célula hospedeira, 2) internalização do parasita, 3) formação e maturação do TcPV e 4) fuga para o citosol (Ferri & Edreira, 2021).

A adesão envolve o reconhecimento de várias moléculas presentes na superfície do parasita e da célula hospedeira e estas são diferentes de acordo com as cepas envolvidas no processo de interação. Além disso, diferentes mecanismos estão envolvidos na invasão da célula hospedeira de acordo com a forma infectiva envolvida (Alba Soto and González Cappa, 2019).

As células normalmente interagem com o ambiente que as rodeia mantendo a composição lipídica e proteica da MP por mecanismos endocíticos. Esses mecanismos envolvidos na adesão celular são importantes para diferentes processos em uma ampla variedade de tipos de células. Classicamente, eles são classificados em uma série de vias independentes de clatrina, bem como endocitose mediada por clatrina (CME), cavéolas, fagocitose, macropinocitose e rufos dorsais circulares (Doherty & McMahon, 2009). E os patógenos frequentemente exploram as vias endocíticas para facilitar a sua internalização à célula hospedeira (Coombes & Robey, 2010). As moléculas da superfamília trans-sialidase (TS) de tripomastigotas podem se ligar a componentes da matriz extracelular (EMCs) do hospedeiro, como laminina, colágeno, fibronectina, trombospondina e proteoglicanos de sulfato de heparano (Caradonna & Burleigh, 2011; Rodríguez-Bejarano et al., 2021) e utilizá-los para mobilização em direção às células hospedeiras, sendo esta uma característica importante para o estabelecimento da infecção por *T. cruzi*.

A ligação de tripomastigotas a EMCs forma interações estáveis antes do parasita entrar no citoplasma através de glicoproteínas de superfície (mucinas e trans-sialidasas), ligando-se aos seus receptores de superfície celular e evitando a ação das proteases. Tais moléculas têm muitas funções, pois podem ser adesinas, destruir EMCs, modificar ligantes, ajudar a evadir o sistema imunológico ou ativar cascatas de sinalização nas células do parasita e do hospedeiro (Alves & Colli, 2008; Kulkarni et al., 2009). Um evento muito importante no reconhecimento do parasita consiste na modificação das mucinas da superfície pelo ácido siálico eliminado da membrana da célula hospedeira pela ação da trans-sialidase (Jobs et al., 2010; Muia et al., 2010).

Para *T. cruzi* vencer as barreiras impostas pela célula hospedeira e invadí-la, pode recorrer a três mecanismos principais de internalização. Nomeadamente, a via de recrutamento mediado por Ca^{2+} e fusão de lisossomos ao local de entrada, via de endocitose da membrana plasmática e a via da autofagia. Estes mecanismos envolvem várias vias de maneira coordenada e integrada (Ferri & Edreira, 2021).

A via de recrutamento mediado por Ca^{2+} e fusão de lisossomos ao local de entrada (**Figuras 5: 1-3**), ocorre após a lesão da membrana plasmática, sendo que a fusão dos lisossomos depende de Ca^{2+} , foi demonstrada pela exposição do domínio luminal da LAMP-1 lisossomal e da

isoforma VII da sinaptotagmina (SytVII), um suposto sensor de Ca^{2+} na exocitose (Sugita et al., 2001). E durante a lesão celular é secretada a enzima lisossomal Esfingomielinase Ácida (ASM) durante a exposição de proteínas luminais lisossomais na superfície da célula, o que promove o reparo da membrana plasmática (Tam et al., 2010) (**Figuras 5: 1-3**). Também são secretadas as cisteína proteases lisossomais catepsina B e L que podem participar do processo de reparo, facilitando o acesso da ASM à membrana (Castro-Gomes et al., 2016). A formação de vesículas endocíticas enriquecidas com ceramida podem facilitar a entrada de tripomastigotas e a inibição de ASM reduz a internalização de tripomastigotas, no entanto, quando se adiciona a esfingomielinase extracelular a inibição pode ser revertida (Fernandes et al., 2011).

A outra via de internalização que *T. cruzi* utiliza é a via de endocitose da membrana plasmática **Figuras 5:4-7**. É reconhecido que os processos endocíticos podem ser divididos em diferentes classes: mediados por clatrina, mediados por cavéolas, mediados por microdomínios de membrana, macropinocitose e fagocitose (Chou et al., 2011). *T. cruzi* explora várias dessas vias endocíticas para invadir as células hospedeiras (Barrias et al., 2013) (**Figuras 5: 4-7**).

A endocitose mediada por clatrina na internalização de *T. cruzi* foi recentemente evidenciada (**Figura 5:5**). Vesículas contendo clatrina e filamentos de actina foram localizados em locais de fixação e internalização de parasitas e ao redor do TcPV nascente. Conseqüentemente, a inibição específica da formação de vesículas revestidas de clatrina prejudica a internalização de *T. cruzi* (Barrias et al., 2019).

A macropinocitose, um processo conduzido pela actina originalmente descrito como um mecanismo de captação inespecífica de fluido em grandes vesículas citoplasmáticas, também foi implicado na invasão de células hospedeiras por *T. cruzi* (King e Kay, 2019) (**Figura 5:6**). O macropinosomo nascente acumula PI3P e Rab5 ativo, que regula a fusão de organelas membranosas nos estágios iniciais da endocitose (Feliciano et al., 2011). A sinalização envolvendo PIP3, Ras e Rac direcionam a polimerização da actina para a periferia do corpo macropinocítico (Kay et al., 2018). Foi demonstrado o envolvimento da macropinocitose como mecanismo de internalização de *T. cruzi* através do bloqueio da internalização utilizando inibidores de macropinocitose, como amilorida, rottlerin e IPA3. Nesse sentido, a estimulação da atividade macropinocítica através da ativação da proteína quinase C (PKC) pelo Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) mostrou um aumento da internalização de parasitas. Além disso, a colocalização em locais de entrada de tripomastigotas com o efector rabankirina 5 (Rab5),

tirosina quinases, microfilamentos Pak1 e actina, confirmou a formação de macropinosomas (Barrias et al., 2012).

No mecanismo de invasão dependente do endossomo Rab5/Rab7 é necessário o receptor tipo Toll 2 (TLR2) para ativar a ligação de PI3K e Rab5 aos endossomos iniciais no mecanismo (Maganto-Garcia et al., 2008). As formas AEs empregam um mecanismo semelhante à fagocitose para invadir células fagocíticas não profissionais (Fernandes et al., 2013), com participação positiva de Cdc42, N-WASP, WAVE2 e Rac1, e regulação negativa de RhoA (Bonfim-Melo et al., 2018b) (**Figura 5:7**).

Além disso, a interação das AEs com células HeLa produziu um aumento na fosforilação de ERK1/2, enquanto o pré-tratamento de células HeLa com um inibidor de ERK1/2 teve um efeito negativo na internalização. Estes resultados demonstram um papel fundamental para a via PI3K/AKT e ERK durante a invasão de AE de *T. cruzi* (Ferreira et al., 2019), provavelmente através da ativação de proteínas que regulam a remodelação de microfilamentos, como calpaína, FAK e cortactina (Bonfim-Melo et al., 2018a).

Atualmente, é proposto que a endocitose independente do lisossomo é o principal mecanismo de invasão utilizado pelos TCTs (Burleigh, 2005; Cortez et al., 2016). Evidências experimentais de tal achado, demonstraram que aproximadamente 20 a 25% dos tripomastigotas internalizados estão associados a lisossomos, enquanto 50% dos parasitas invasores exploram um mecanismo de invasão alternativo dependente da PI3-quinase, envolvendo um vacúolo derivado da membrana plasmática da célula hospedeira enriquecido nos produtos lipídicos de PI3-quinases de classe I, Fosfatidilinositol 3-Fosfato PI3P/ Fosfatidilinositol 3,4-bifosfato (P3,4P2) (Woolsey et al., 2003). Neste mecanismo endocítico de internalização, a jusante da entrada celular, o marcador de proteína associada ao endossomo precoce (EEA1) nunca foi associado aos vacúolos contendo parasitas; em vez disso, uma fusão lisossômica gradual foi revelada pela aquisição de marcadores lisossômicos, como LAMP-1 e traçadores endocíticos de fase fluida de o compartimento lisossomal (Woolsey et al., 2003).

A última via de invasão que pode ser utilizada por *T. cruzi* é a via da autofagia (**Figura 5:8**). Ela é uma via alternativa de internalização de *T. cruzi* que foi evidenciada em células em stress nutricional, onde a indução da autofagia foi um modulador positivo da invasão (**Figura 5:8**). Por outro lado, a interrupção da autofagia dos mamíferos levou a uma redução na infectividade (Salassa e Romano, 2019). A via da autofagia consiste em vários eventos coordenados e consecutivos: iniciação, alongamento, maturação e fusão dos lisossomos ao autofagossomo. Após a ativação, a biogênese do autofagossomo é iniciada com a indução e

nucleação do fagóforo, uma estrutura de membrana dupla que cresce para internalizar a carga autofágica, e o recrutamento da maquinaria autofágica central (Dikic e Elazar, 2018). LC3-II lipídico é necessário na biogênese do autofagossomo e, como forma uma associação estável com a membrana dos autofagossomos, é usado como marcador de autofagia (Tanida et al., 2008). A presença de LC3 na membrana do TcPV durante o processo de internalização mostrou uma conexão entre os TCTs e a via autofágica da célula hospedeira (Romano et al., 2009).

Estudos demonstraram que na ausência de genes específicos de autofagia Atg5 ou Beclin1, a infecção é reduzida. O que confirma a necessidade de um compartimento derivado de autofagia na invasão mediada por autofagia. Além disso, a privação e o tratamento com rapamicina induziram um aumento de LAMP-1 em vesículas contendo *T. cruzi*, indicando que a associação lisossomal ao TcPV e a consequente formação de autofagossomos foram necessárias para um aumento da internalização do parasita (Romano et al., 2009).

Uma vez que *T. cruzi* é internalizado pela célula hospedeira, por algumas das vias mencionadas, o tempo que o parasita permanece no TcPV pode variar entre as formas infecciosas, de 1 hora para amastigotas e 2 horas para tripomastigotas derivados de cultura de tecidos a várias horas para tripomastigotas metacíclicos (De lana & de Menezes Machado, 2017). Diversas proteínas são recrutadas para o TcPV em diferentes momentos durante o processo de biogênese e maturação (Batista et al., 2020). Dentro dessas proteínas estão as SNAREs, proteínas de fusão que regulam o acoplamento de grânulos e vesículas às membranas alvo, incluindo a membrana plasmática (Wang et al., 2017).

As proteínas de membrana associadas à vesícula 3 (VAMP3) e VAMP7 são recrutadas conseqüentemente para o TcPV. VAMP3, geralmente presente na reciclagem ou nos endossomos iniciais, não é essencial para a invasão, enquanto os complexos SNARE envolvendo VAMP7, necessários para a fusão tardia do endossomo/lisossomo, são cruciais no estabelecimento da infecção por *T. cruzi* (Cueto et al., 2017). Além disso, os compartimentos endocíticos precoces (vesículas positivas para Rab5, Rab22a e Rab21) e tardios (Rab7 e Rab39a), também recrutados para o TcPV nos primeiros momentos após a internalização, regulam o trânsito do TcPV e promovem a fusão com os lisossomos (Salassa et al. 2020). A maturação do TcPV é caracterizada por uma interação inicial com vesículas positivas para Rab5 e VAMP3, seguida pelo recrutamento de Rab7 e VAMP7, para finalmente se fundir com os lisossomos (Cueto et al., 2017; Salassa et al., 2020).

Está bem estabelecido que a fusão dos lisossomos ao TcPV induz a acidificação que desencadeia a ruptura do vacúolo e subsequente liberação de *T. cruzi* no citosol da célula

hospedeira (Ley et al., 1990). A viabilidade de *T. cruzi* no TcPV depende de um mecanismo de defesa antioxidante altamente eficaz envolvendo enzimas antioxidantes especializadas, como peroxidases e superóxido dismutases (SODs), que protegem o parasita contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Cardoso et al., 2016).

Curiosamente, foi demonstrado que o estresse oxidativo é um intensificador da infecção por *T. cruzi* em macrófagos (Paiva et al., 2012). Porém, uma hipótese plausível é que o *T. cruzi* necessita de níveis mínimos de ERO, sinalizando para replicação, enquanto altos níveis de ERO são deletérios (Goes et al., 2016). Demonstrou-se que LAMP-1 e 2 fortemente sialiladas, localizadas no revestimento interno do TcPV, protegem o TcPV da lise (Rubin-de-Celis et al., 2006). Além disso, LAMP-1 e 2 são essenciais para reter o parasita intracelular (Albertti et al., 2010) e evitar a saída do parasita da célula (Caradonna e Burleigh, 2011).

Sob condições ácidas, a ruptura do TcPV ocorre através de diversas proteínas do *T. cruzi*, como a TS secretada (Hall et al., 1992) e duas proteínas formadoras de poros, TcTOX (Andrews et al., 1990) e LYT1 (Manning -Cela et al., 2001). Nos TCTs, a expressão de TS induz o escape do TcPV pela dessialilação de LAMP-1 e 2, tornando as membranas mais suscetíveis à ruptura por proteínas formadoras de poros (Hall et al., 1992; Rubin-de-Celis et al., 2006). Os poros são então formados por TcTOX e LYT1. Curiosamente, TcTOX e LYT1 compartilham características semelhantes: ambos são secretados, apresentam reatividade cruzada com anticorpos C9 e possuem atividade hemolítica em pH baixo (Benabdellah et al., 2007; Friedrich et al., 2012; De lana & de Menezes Machado, 2017; Takagi *et al.*, 2022). Após a saída do parasita do TcPV e encontrar-se no citoplasma da célula hospedeira, as amastigotas usam as vias celulares e metabólicas do hospedeiro para multiplicarem. Elas replicam-se por fissão binária até nove ciclos até esgota os recursos metabólicos em um período de aproximadamente 4 a 7 dias e se diferenciam em tripomastigota (Taylor et al., 2020; Ferri & Edreira, 2021; Takagi *et al.*, 2022). Alguns autores acreditam que um fator limitante para a multiplicação do parasita é a área citoplasmática da célula hospedeira. Durante a divisão amastigota, várias transformações ocorrem, como crescimento do parasita, duplicação do núcleo basal, divisão inicial do cinetoplasto, modificação da cromatina nuclear e formação de um novo flagelo (De lana & de Menezes Machado, 2017).

De forma genérica, a internalização de *T. cruzi*, incluindo a formação de TcPV e a fuga para o citoplasma da célula hospedeira, pode ser concluída 2 horas após a infecção (6, 28). No entanto, Takagi *et al.* (2022) utilizando amostras com células 3T3, 4 horas após a infecção, encontraram alguns parasitas que parecem estar no meio do processo de internalização.

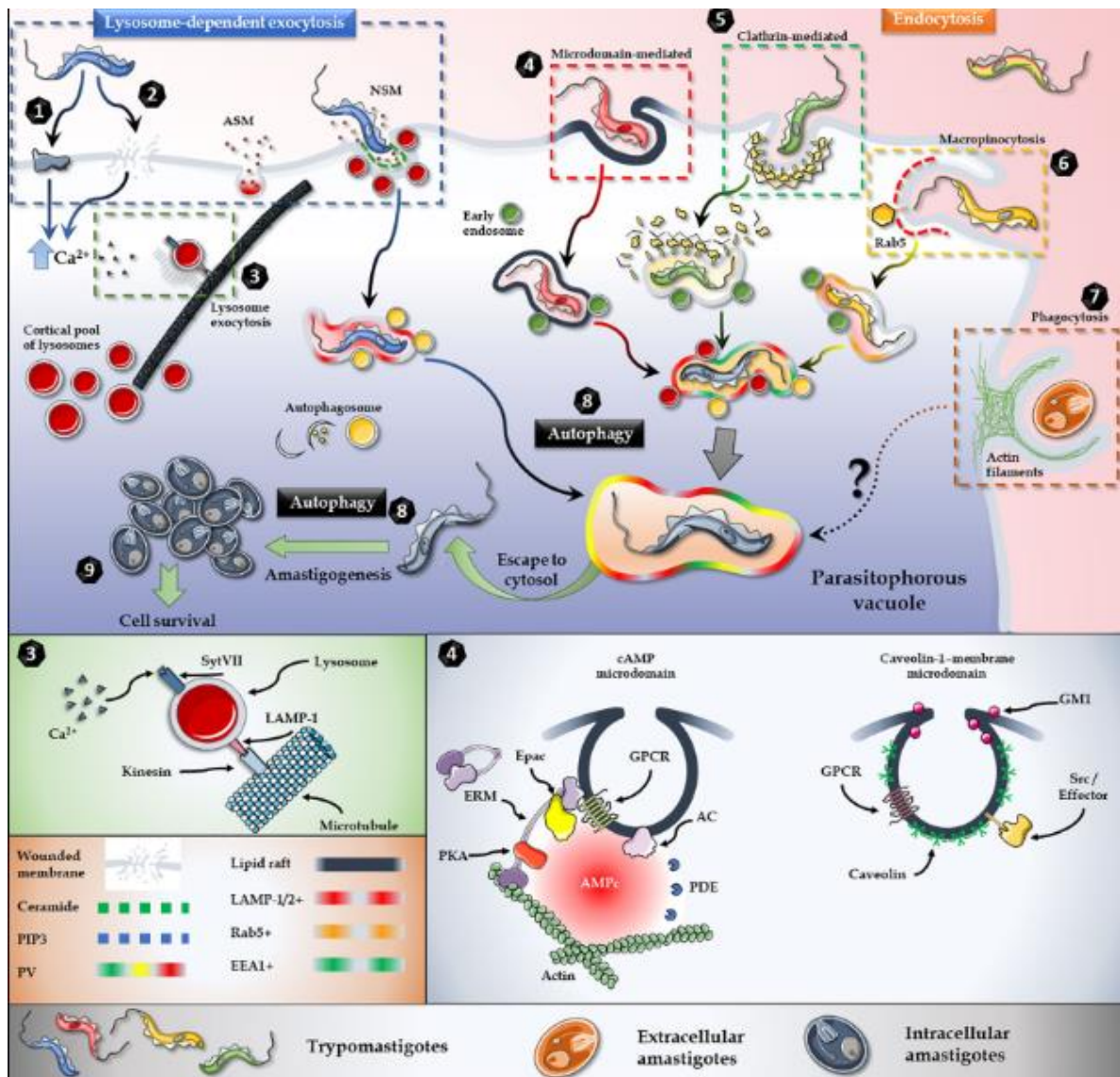


Figura 5. Modelo de invasão de *T. cruzi*. A exocitose dos lisossomas envolve proteínas de superfície/secretadas (1) ou microlesões (2) que desencadeiam uma elevação nos níveis intracelulares de Ca^{2+} e o recrutamento de lisossomas mediado por microtúbulos/cinesina das áreas circundantes para o local de entrada do parasita (3). A esfingomielinase ácida do hospedeiro (ASM) e uma esfingomielinase neutra do parasita (NSM) são secretadas no meio extracelular e participam da degradação da esfingomielina em ceramida e fosforilcolina no folheto externo da membrana plasmática (3). Mecanismos endocíticos, como endocitose dependente de balsas lipídicas (4), endocitose mediada por clatrina (5) e macropinocitose (6) também convergem na internalização do parasita. Os amastigotas extracelulares, por outro lado, empregam um mecanismo semelhante à fagocitose para invasão (7). Além disso, a autofagia é um ator chave durante a invasão e também promove a diferenciação de tripomastigotas para amastigotas (8). Em resumo, independentemente do estágio do parasita, ou da cascata ativada, todas as vias de internalização culminam no vacúolo parasitóforo, de onde o parasita escapa para o citoplasma e se diferencia em amastigotas e prolifera (9). As figuras foram criadas usando imagens da Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License. (<http://smart.servier.com>). Servier Medical Art da Servier está licenciada sob uma licença Creative Commons Attribution 3.0 Unported. Fonte: Ferri & Edreira, 2021.

1.9.1.1. Moléculas do hospedeiro envolvidas na interação parasita-hospedeiro

Uma vez que o processo de entrada de *T. cruzi* é multifatorial, diversas moléculas da membrana da célula hospedeira participam com potenciais auxiliadoras no reconhecimento desde protozoário. Entretanto, esses fatores podem variar dependendo do tipo de célula envolvida na interação (Kipnis et al., 1979). O mesmo grupo de pesquisadores mostrou que macrófagos pré-tratados com tripsina, soro antimacrófago ou com a incubação de parasitas e citocalasina B não tiveram efeito na absorção/entrada do parasita. Entretanto, o tratamento prévio de macrófagos com citocalasina B bloqueou a invasão do parasita. Em outros estudos realizados em célula Vero e musculares de pintinho, como células hospedeiras, pré-tratadas com concanavalina A, fitohemaglutinina, aglutinina de gérmen de trigo ou ricina prejudicaram a invasão tripomastigota. Quando realizaram o tratamento com tripsina e periodato observaram os parasitárias não infectaram as células hospedeiras, esses achado mostrou claramente a participação de proteínas e glicoproteínas durante o processo de invasão (Henriquez et al. 1981).

Outros receptores que são conhecidos por participarem no reconhecimento de *T. cruzi* são os receptores tipo-Toll 4 e os receptores tipo-Toll 9. Também supõe-se que a ceramida GIPL isolada de epimastigotas de *T. cruzi* interage com o receptor Toll-like 4. Receptor Toll-like 9 é conhecido por ser ativado por DNA rico em CpG metilado e DNA de *T. cruzi* em macrófagos (Schmitz et al., 2009; De Souza et al., 2010).

1.9.1.2. Moléculas do parasita envolvidas na invasão das formas tripomastigotas metacíclicas (TM)

As moléculas envolvidas no processo de invasão celular das formas TM são as glicoproteínas 82 (gp82), gp90, gp35/50, proteína rica em serina, alanina e prolina (SAP), proteínas de membrana de superfície de *Trypanosoma cruzi* (TcSMP), conforme ilustrado na **Figura 6**. Somente a SAP é secretada as outras proteínas são secretadas e expressadas na superfície do parasita (Ferri & Edreira, 2021).

A gp82 é umas das glicoproteínas membro da família gp85/TS ,envolvidas na adesão de *T. cruzi* na célula hospedeira, também é um fator de virulência específico da TM. Ela ativa as vias de sinalização fosfolipase C (PLC), rapamicina em mamíferos (mTOR) e PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) e a sua principal função é de mobilização de Ca²⁺ e lisossoma. Esta proteína está ligada à membrana celular externa do parasita por uma âncora de

glicosilfosfatidilinositol (GPI), que é suscetível à clivagem por uma fosfolipase C endógena específica do fosfatidilinositol (PI-PLC) e liberada no meio extracelular.

Durante o processo de invasão de TMs, a gp82 interage com receptor da célula hospedeira, a proteína 2 da membrana associada ao lisossoma (LAMP-2) (Rodrigues et al., 2019), e ativa as vias de sinalização que levam mobilização das reservas de Ca^{2+} intracelular sensíveis a tapsigargina e à mobilização do lisossoma na célula hospedeira (Yoshida et al., 2000). A ativação da PLC na célula hospedeira gera diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), que induz a proteína quinase C (PKC) e promove a liberação de Ca^{2+} de compartimentos sensíveis ao IP3 (Maeda et al., 2012). O alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) também são ativados durante a invasão de MTs. A elevação na concentração de Ca^{2+} citosólico desencadeada por essas vias promove a ruptura do citoesqueleto de actina e mobilização do lisossomo para a periferia celular, o que promove a internalização do parasita (Martins et al., 2011; Cortez et al., 2014).

Outra glicoproteína de superfície consirada chave dos TM é a gp90, ela também membro da superfamília gp85/TS. No entanto, contrariamente à gp82, ela tem um efeito negativo na invasão do parasita (Bubis et al., 2018). Estudos iniciais mostraram uma correlação inversa entre os níveis de expressão de gp90 e a infectividade de MTs (Málaga e Yoshida, 2001). Além disso, os anticorpos monoclonais confirmaram níveis baixos de gp90 numa estirpe altamente invasiva (cepa CL), enquanto a expressão elevada de gp90 foi observada numa estirpe pouco invasiva (cepa G) (Ruiz et al., 1998). Embora a gp90 se ligue à célula hospedeira, ela não consegue desencadear a mobilização citosólica de Ca^{2+} (Ruiz et al., 1998). A inibição da propagação do lisossoma da célula hospedeira foi recentemente proposta como o mecanismo pelo qual a gp90 exerce o seu papel regulador negativo (Rodrigues et al., 2017).

As mucinas Gp35/50 são proteínas altamente glicosiladas expressas pelas formas TMs de *T. cruzi* (Ramirez et al., 1993). Tal como a gp82, a gp35/50 tem a capacidade de desencadear a elevação intracelular de Ca^{2+} quando se liga à célula hospedeira (Dorta et al., 1995; Ruiz et al., 1998). No entanto, a invasão mediada pela gp35/50 induz o recrutamento de actina, em contraste com a gp82, que desencadeia vias de sinalização que levam à desmontagem da F-actina (Ferreira et al., 2006). Além disso, descobriu-se que a expressão de alto nível de gp35/50 estava inversamente correlacionada com a infectividade (Ruiz et al., 1998).

Quando realizado tratamento de TMs com neuraminidase antes dos experimentos de invasão, foi observado um aumento na infectividade, provavelmente devido ao fato de que a gp35/50 desialilada pode interagir com a célula hospedeira (Yoshida et al., 1997).

Quanto as SAPs, diversas isoformas com diferentes localizações celulares, são expressos nos diferentes estágios de desenvolvimento do parasita. Em particular, os peptídeos SAP foram identificados por espectrometria de massa em vesículas e frações de proteínas solúveis de epimastigotas e meio condicionado de TMs. Os níveis de transcrição e expressão proteica de SAP em TMs são duas vezes mais elevados que nos epimastigotas, de acordo com o seu papel proposto na adesão e invasão celular (Zanforlin et al., 2013). A este respeito, o facto de gp82 e SAP partilharem a capacidade de induzir sinalização de Ca^{2+} e mobilização de lisossomas, levou à hipótese de que ambas as moléculas apresentam um efeito sinérgico no processo de invasão da célula hospedeira de TMs (Baida et al., 2006; Zanforlin e outros, 2013).

A família de proteínas de membrana de superfície de *Trypanosoma cruzi* (TcSMP), recentemente descrita, foi descoberto que ela é expressada por todos os estagios de desenvolvimento de *T. cruzi*, geralmente localizada na superfície no entanto, estão presentes no secretoma de epimastigotas e TMs. Essa família possui duas características principais típicas de proteínas de superfície, um peptídeo sinal N-terminal e uma sequência hidrofóbica C-terminal, prevista para ser um domínio transmembranar, em vez da ancoragem GPI mais prevalente (Martins et al., 2015). Da mesma forma que o SAP, foi demonstrado que TcSMPs promovem uma mobilização de lisossomos e internalização de parasitas mais fraca do que gp82, sugerindo um papel auxiliar na invasão de parasitas (Martins et al., 2015).

1.9.1.3. Moléculas envolvidas na invasão das formas tripomastigotas de cultura em tecido (TCT)

Quanto as formas TCT as moléculas envolvidas na invasão da células hospedeira são as TS (trans-sialidase) e iTS (forma inativa de TS), Tc85, TSSA, TcOPB, conforme ilustrado na **Figura 6**. A Tc85 e TSSA são moléculas de superfície, TcOPB é secretada e a TS and iTS é molécula da superfície mas também é secretada (Ferri & Edreira, 2021).

A trans-sialidase (TS) de *T. cruzi* é a única trans-sialidase entre as diferentes moléculas de superfície envolvidas na invasão dos TCTs. Ela é também um importante fator de virulência do parasita. Conforme referido no subcapítulo anterior, *T. cruzi* é incapaz de sintetizar ácido siálico (AS), TS permite que TCT transfiram resíduos AS terminais ligados a2,3 a b-galactopiranoses terminais de macromoléculas doadoras de células hospedeiras para glicanos de proteínas do tipo mucina exibidas na membrana do parasita (Schenkman et al., 1991 ; da Fonseca et al., 2019; Campetella et al., 2020).

A geração de uma superfície sialilada desempenha um papel central na promoção da evasão das respostas imunes, favorecendo a sobrevivência e o estabelecimento da doença crônica (Nardy et al., 2016). Além disso, a transferência de AS para a superfície do parasita cria o Epítopo Específico do Estágio 3 (Ssp-3) que promove a invasão da célula hospedeira (Schenkman et al., 1991). A TS também foi postulada como contra-receptor para a ligação de TCTs aos receptores α 2,3-sialil na célula hospedeira, como um prelúdio para a invasão de *T. cruzi* (Ming et al., 1993). As vias de sinalização implicadas na promoção da invasão mediada por TS incluem as vias PI3K/AKT (Chuenkova et al., 2001; Butler et al., 2013) e as vias MAPK/ERK (proteína quinase ativada por mitógeno/quinase regulada extracelular) (Chuenkova e Pereira, 2001).

A liberação de TS na corrente sanguínea permite que *T. cruzi* manipule o padrão de sialilação superficial da célula alvo e de diferentes tipos de células distantes do local da infecção. Esta forma solúvel de TS tem estado envolvida, entre outros processos, na imunomodulação do hospedeiro e em alterações hematológicas, principalmente pela perturbação da homeostase do sialil na superfície celular (Campetella et al., 2020).

Além disso, foram relatadas expressões diferenciais de TS e expressão gênica entre diferentes cepas de *T. cruzi*. Em um modelo murino, cepas altamente virulentas do parasita, pertencentes ao DTU-VI, expressaram e liberaram grandes quantidades de TS, enquanto o oposto foi observado em camundongos infectados pelas cepas DTU-I de baixa virulência (Risso et al., 2004; Burgos et al., 2013).

Curiosamente, uma mutação pontual que ocorre naturalmente, a substituição Y342H, é responsável pela falta de atividade de transsialilação que gera uma forma inativa de TS (iTTS) (Cremona et al., 1995). Ainda assim, a iTTS se comporta como uma proteína semelhante à lectina, que mantém a capacidade de se ligar a resíduos AS e b-galactose (Cremona et al., 1999). Dados experimentais sugerem fortemente que a iTTS confere papéis alternativos e/ou complementares à TS na virulência e patogênese do parasita (Campetella et al., 2020).

Outra molécula de superfície de TCTs com afinidade pela matriz extracelular é a família Tc85 (Giordano et al., 1999). Pertencentes à superfamília gp85/TS, as proteínas Tc85 carecem de atividade enzimática e, embora incapazes de transferir AS, têm sido implicadas na adesão e invasão celular (Mattos et al., 2014). Um domínio semelhante à laminina-G (LamG) no terminal C da gp85/TS parece ser responsável pela ligação a diferentes receptores presentes na matriz extracelular e na superfície da célula hospedeira (Teixeira et al., 2015). Dois motivos no domínio LamG foram descritos: o motivo FLY (VTVxNVxLYNRPLN), presente no terminal

C das proteínas Tc85, medeia a interação com citoqueratinas (Tonelli et al., 2010), e o motivo TS9 que mostrou capacidade significativa de ligação celular (Teixeira et al., 2015).

Em particular, o FLY tem sido implicado na remodelação da citoqueratina-18, na ativação da via de sinalização ERK1/2 e no aumento da internalização (Magdesian et al., 2007). Foi demonstrado que o FLY interage com o endotélio de maneira órgão-dependente, com avidéz significativamente maior para a vasculatura cardíaca (Tonelli et al., 2010). Estes resultados, e o fato de TS9 e FLY estarem separados um do outro por aproximadamente 100 aminoácidos na sequência primária das proteínas gp85/TS, estão de acordo com a ideia de que TS9 e FLY compreendem um sítio de ligação conformacional não linear (Teixeira et al., 2015).

O pequeno antígeno de superfície de tripomastigota (TSSA) é uma pequena proteína semelhante à mucina da família TcMUC dos genes de mucina de *T. cruzi*, às principais mucinas na superfície dos TCTs e às estruturas do epítopo Ssp-3 (Buscaglia et al., 2004; Campo et al., 2006). Embora o TSSA não seja um acceptor de AS, ele se liga a células de mamíferos e induz a sinalização de Ca²⁺ (Cánepa et al., 2012a). Existem quatro variantes alélicas (TSSA I-IV), cada uma correspondendo a um DTU ancestral (I-IV), enquanto que em genomas híbridos (DTUV-VI) podem ser encontrados isoformas II e III de TSSA (Balouz et al., 2021).

TSSAII apresentou maior adesão às células hospedeiras do que o TSSAI. Além disso, o TSSAII provocou um aumento muito mais rápido e sustentado no Ca²⁺ intracelular e promoveu uma estimulação mais forte da via ERK1/2, do que o TSSA I (Cánepa et al., 2012a). Experimentos de mapeamento e ensaios de ligação celular revelaram que pelo menos dois motivos peptídicos são críticos para a interação da variante “adesiva” de TSSA com o (s) receptor (es) da superfície da célula hospedeira antes da internalização do tripomastigota. Estas observações foram apoiadas pelo facto de os tripomastigotas transgênicos que sobre-expressam o TSSA “adesivo” apresentarem melhor adesão e infectividade para linhas celulares não macrofágicas (Cámara et al., 2017).

A cruzipaína (Czp), molécula abordada no subcapítulo 1.8, ela é a cisteína peptidase mais notória, é expressa como uma mistura complexa de isoformas em todas as formas de *T. cruzi* e localizada principalmente em organelas relacionadas ao lisossomo (Lima et al., 2012), demonstrou ser necessária, mas não é essencial para a invasão (San Francisco et al., 2017).

A Czp liberada por tripomastigota promove a invasão através de sua atividade de cisteína protease, produzindo bradicinina a partir de cininogênio ligado à membrana na superfície da célula hospedeira e desencadeando sinalização de Ca²⁺ mediada por IP3 após reconhecimento pelo receptor B2 de bradicinina (B2R) (Scharfstein et al., 2000).

1.9.1.4. Moléculas envolvidas na invasão das formas amastigotas extracelulares (AE)

Quanto as amastigota extracelulares, as moléculas envolvidas na invasão da célula hospedeira são as Amastina, P21, TcMVK (mevalonato quinase) e Ssp-4 (proteína de superfície específica 4), conforme ilustrado na **Figura 6**. A Amastina e Ssp-4 são moléculas de superfície, P21, TcMVK e Ssp-4, são moléculas secretadas (Ferri & Edreira, 2021). A família multigênica da amastina foi originalmente identificada pela triagem de uma biblioteca de cDNA de amastigotas (Teixeira et al., 1994). Em particular, δ Amastina, uma glicoproteína transmembrana altamente expressa na superfície de amastigotas intracelulares, tem sido implicada na invasão e diferenciação de células AEs (Cruz et al., 2012). Embora a amastina esteja presente em todas as cepas sequenciadas de *T. cruzi* (Cerqueira et al., 2008), descobriu-se que os níveis de transcritos estão regulados negativamente em amastigotas da cepa G (Cruz et al., 2012; Kangussu-Marcolino et al., 2013).

Foi demonstrado que a δ -amastin recombinante se liga às células de maneira saturável e dependente da dose e foi capaz de inibir a internalização do parasita, sugerindo um papel da amastin na invasão de *T. cruzi* (Cruz et al., 2012). Além disso, em AEs transgênicos, a superexpressão de amastina promoveu tropismo hepático durante infecções *in vivo* em camundongos e acelerou a amastigogênese (Cruz et al., 2012). O envolvimento das amastinas na virulência de *T. cruzi* também foi apoiado pela nocaute da δ -amastina em *Leshmania braziliensis*, o que resultou em uma diminuição na sobrevivência e proliferação de parasitas intracelulares após infecção *in vitro* por macrófagos e nenhum parasita detectável após infecções *in vivo* (de Paiva e outros, 2015).

Proteínas secretadas de EAs, como P21, mevalonato quinase (TcMVK) e proteína de superfície específica 4 (Ssp-4) proteína de membrana, medeiam a sinalização da célula hospedeira durante o mecanismo de invasão semelhante à fagocitose (Rodrigues et al., 2012; Ferreira et al., 2016; Florentino et al., 2018).

A TcMVK localiza-se nos glicossomos e também pode ser secretada no meio extracelular, onde modula a invasão da célula hospedeira, independentemente de sua função catalítica em *T. cruzi*. Mais precisamente, a TcMVK ativa as quinases relacionadas à actina FAK (quinase de adesão focal) e PAK (quinase ativada por p21), e os componentes da via MAPK, ERK e p38 para promover a internalização de AEs (Ferreira et al., 2016).

Ssp-4 é uma importante glicoproteína ancorada em GPI de superfície que é secretada pelos EAs (Andrews et al., 1987). Embora a expressão de AEs Ssp-4 não se correlacione com a infectividade, a glicosilação de Ssp-4 foi associada à invasão da célula hospedeira. Foi

demonstrado que apenas AEs de cepas altamente infecciosas secretaram um Ssp-4 diferencialmente glicosilado em trilhas de vesículas no local de entrada, contribuindo para o recrutamento de Galectina-3 (Gal-3) e estabelecendo uma ligação física entre o parasita e a superfície da célula hospedeira (Florentino et al., 2018). Gal-3, uma proteína de ligação a β -galactosídeo de 31kDa, é recrutada para o local de entrada dos Aes durante a invasão celular e participa do tráfego intracelular do parasita (Machado et al., 2014).

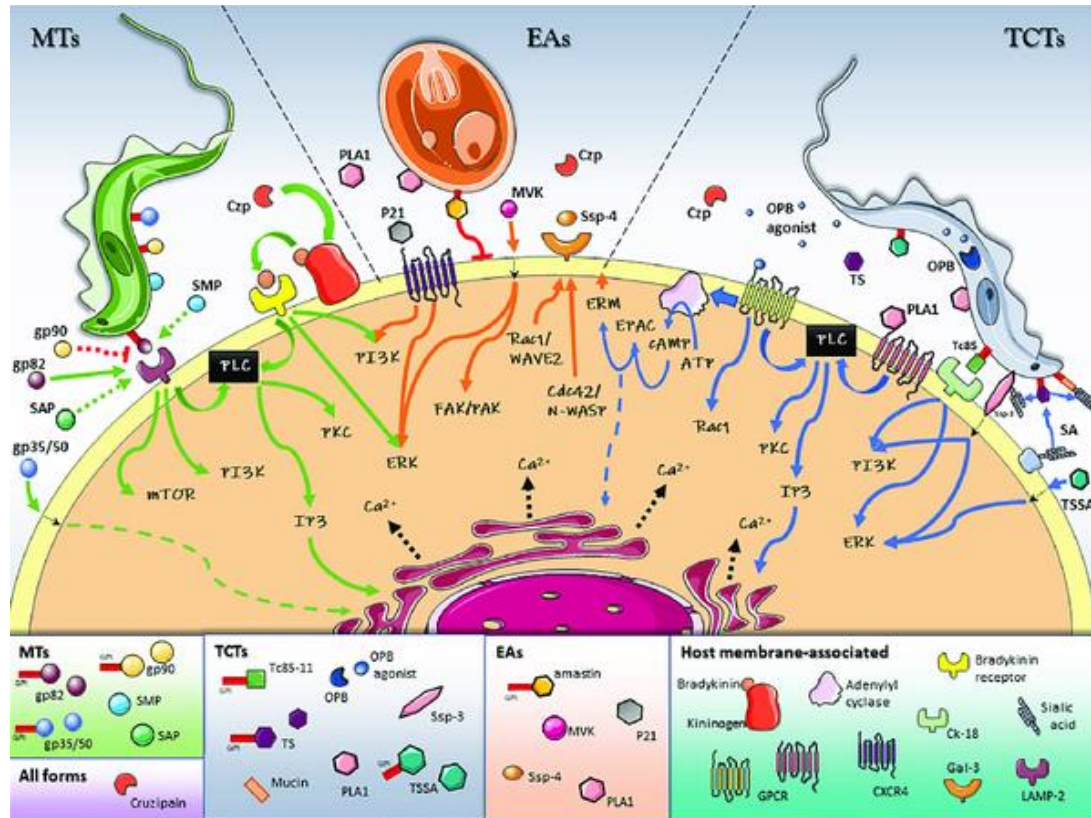


Figura 6. Modelo esquemático de interação de *T. cruzi* com as proteínas da célula hospedeira e ativação de vias de sinalização durante a invasão. Moléculas de superfície específicas do estágio, expressas na membrana do parasita ou liberadas no meio extracelular, desempenham um papel essencial no reconhecimento, adesão e ativação de vias de sinalização que levam a uma invasão bem-sucedida da célula hospedeira. As figuras foram criadas usando imagens da Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License. (<http://smart.servier.com>). Servier Medical Art da Servier está licenciada sob uma licença Creative Commons Attribution 3.0 Unported. Fonte: Ferri & Edreira, 2021.

No entanto, existem outras moléculas que participam na invasão. A cruzipaina, conforme abordado no subcapítulo anterior, também é uma molécula que participa na invasão e um importante factor de virulência de *T. cruzi*. Ela é secretada por todas as formas infectivas TM, TCT e AE, conforme ilustrado na **Figura 6**. A fosfolipase A1 associada à membrana (TcPLA1), também participa na invasão, ela é uma molécula de superfície e ainda é secretado somente pelas formas TCT e AE, ela pode ser encontrada no meio extracelular (Belaunzarán et al., 2007; Ferri & Edreira, 2021). Células hospedeiras expostas ao meio condicionado de AEs, TCTs ou

TcPLA1 recombinante apresentaram perfis lipídicos modificados, com concentrações celulares aumentadas de ácidos graxos livres, diacilglicerol e lisofosfatidilcolina, que contribuíram para a ativação concomitante da via PKC (Belaunzarán et al., 2013). Notavelmente, a PKC foi previamente implicada na invasão do parasita, sugerindo que a Tc-PLA1 participaria nos eventos que precedem a invasão da célula hospedeira (Watanabe Costa et al., 2016).

Conforme abordado, diversas moléculas das formas infetivas de *T. cruzi* participam na interação patógeno-hospedeiro o que culminam no desenvolvimento da DC. Porém, ainda não é conhecido o papel que essas moléculas desempenham no estabelecimento da DC ou na interação patógeno hospedeiro de *T. cruzi* e a P21 é uma dessas moléculas. No subcapítulo seguinte será abordada a descoberta e importância da P21.

1.10. DESCOBERTA E IMPORTÂNCIA DA P21 NO PROCESSO INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO DE *Trypanosoma cruzi*

A P21, é uma proteína de 21 kDa, descoberta em 2009, quando buscava-se estudar as proteínas presentes na superfície da membrana de *T. cruzi* que estão envolvidas na interação patógeno-hospedeiro. Demonstramos que esta proteína é ubíqua e é secretada por todas as formas evolutivas de *T. cruzi*. Face a descoberta, realizamos nos anos subsequentes até a atualidade diversos ensaios com a fim de demonstrar o papel desempenhado por esta proteína. Inicialmente, realizamos uma busca na base de dados genômica de *T. cruzi* a fim de encontrar proteínas específicas hipotéticas com elevada probabilidade de serem secretadas ou estarem ancoradas à membrana e relacionadas à invasão da célula hospedeira (Da Silva et al., 2009).

Posteriormente, por meio de tecnologia de DNA recombinante, clonamos o gene nativo da P21 em um plasmídeo (pet28A) depois este gene foi transfectado e incorporado ao genoma da bactéria *Escherichia coli* com a finalidade de obter a forma recombinante da P21. A forma recombinante da P21 (rP21) possui 18 kDa, cauda de poli-histidina contém seis resíduos de cisteína que devem formar ligações dissulfeto, foram realizados ensaios de invasão em célula HeLa infectada com amastigotas extracelulares (AE) e tripomastigotas metacíclicos (TM) da cepa G e CL de *T. cruzi*, para a realização dos ensaios de invasão a célula hospedeira foi tratada com concentrações crescentes de rP21 (10µg/ml; 20µg/ml e 40µg/ml), 30 minutos antes ou no momento em que os parasitas foram adicionados. Os parasitas também foram tratados com diferentes concentrações de anticorpo policlonal anti-rP21. Observamos que o tratamento com o anticorpo inibiu a invasão e o pré-tratamento da célula com a proteína recombinante também

inibiu a invasão. Contudo o tratamento celular com a proteína recombinante feito no momento da invasão celular aumentou a invasão dos parasitas. Esses dados sugerem que a proteína P21 promove a invasão do parasita sendo secretada na interface célula-parasita pois o pré-tratamento provavelmente dessensibilizou o receptor da P21 resultando na inibição da invasão celular da mesma forma ocorrida quando os parasitas foram tratados com o anticorpo anti-rP21 (Da Silva *et al.*, 2009).

Face a esses achados, em 2012, avaliamos o efeito da rP21 em macrófagos inflamatórios durante a fagocitose. Recorrendo a modelo *in vivo* coletaram macrófagos peritoneais em camundongos C57BL/6 previamente infectados com amastigotas de *T. cruzi* da cepa G na presença ou ausência de 40mg/ml de rP21. Tendo observado que rP21 aumenta a fagocitose de maneira independente da dose e do tempo, ligando-se ao receptor de quimiocina CXCR4 ativando a polimerização de actina de forma dependente da via de sinalização PI3-quinase (Rodrigues *et al.*, 2012). Em 2015, verificamos o impacto da rP21 na progressão do processo inflamatório em um modelo de inflamação induzida por esponja de poliéster. Os resultados indicam que rP21 pode recrutar células imunes, induzir a produção de mieloperoxidase e IL-4 e diminuir a formação de vasos sanguíneos em comparação com controles *in vitro* e *in vivo*. Concluimos que a P21 de *T. cruzi* pode ser um alvo potencial para o desenvolvimento de compostos antagonistas do P21 para o tratamento da cardiomiopatia chagásica (Teixeira *et al.*, 2015).

No ano de 2017, avaliamos a atividade antiangiogênica da rP21 de *T. cruzi* e o potencial impacto da proteína nativa no CCC. Nossos dados sugerem que a atividade antiangiogênica da rP21 depende da interação direta da proteína com o receptor CXCR4. Esta capacidade está provavelmente relacionada com a modulação da expressão de genes associados à actina e à angiogênese. Assim, nossos resultados indicam que a P21 de *T. cruzi* é um alvo interessante para o desenvolvimento de agentes terapêuticos inovadores contra o CCC (Teixeira *et al.*, 2017).

Em 2019 (Teixeira *et al.*, 2019) relatamos o papel da P21 em camundongos com infecção tardia por *T. cruzi*. E vimos que o tratamento com rP21 reduziu a carga parasitária, a angiogênese e induz fibrose no tecido cardíaco de camundongos infectados. Além disso, a rP21 reduziu o crescimento de epimastigotas, inibiu a replicação intracelular de amastigotas e modulou o ciclo celular do parasita. Nossos dados sugerem que o P21 controla a replicação do parasita no hospedeiro, apoiando a sobrevivência tanto do parasita quanto do hospedeiro.

Em 2020, demonstramos que a rP21 diminuiu a multiplicação de *T. cruzi* nos mioblastos C2C12, e esse fenômeno está associado à maior polimerização da actina e à maior expressão de IFN- γ e IL-4. Durante a infecção experimental, observamos poucos ninhos cardíacos, infiltrado inflamatório e fibrose em camundongos infectados e tratados com rP21. Esses resultados foram correlacionados com grande expressão de IFN- γ contrabalançada por altos níveis de IL-10, o que foi consistente com a menor lesão tecidual cardíaca encontrada nesses camundongos. Observamos também que sob estresse, como o induzido pela presença da citocina IFN- γ , *T. cruzi* produziu mais P21. O efeito da P21 no controle da replicação de *T. cruzi* pode indicar um mecanismo evolutivo de sobrevivência desenvolvido pelo parasita. Assim, quando submetido a diferentes condições de estresse, o protozoário produz mais P21, o que induz a latência de *T. cruzi* no organismo hospedeiro, possibilitando ao protozoário escapar do sistema imunológico do hospedeiro (Martins *et al.*, 2020).

Face aos achados observados com forma recombinante da P21, o nosso grupo de pesquisadores quis avaliar o efeito da P21 recorrendo as formas infectivas de *T. cruzi* (TM, TCT e AE). Por isso, recorrendo à técnica de CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat- associated protein Cas9) uma ferramenta amplamente utilizada para edição de genomas de uma variedade de organismos de maneira eficiente e rápida (MA *et al.*, 2014), geramos parasitas que não expressam a P21 ou seja, silenciámos os alelos responsáveis pela expressão gênica da P21.

Os experimentos que realizamos com os parasitas geneticamente modificados tinham como finalidade avaliar o impacto da P21 na invasão e multiplicação de *T. cruzi*. Inicialmente o silenciamento do gene da P21 foi realizado em epimastigotas da DTU II (cepa Y) (Teixeira *et al.*, 2022) e os experimentos foram conduzidos em célula HeLa infectada com TM que não expressam a P21. Posteriormente, realizamos o silenciamento do gene da P21 em parasitas da DTU I (cepa G) (Rodrigues, 2022) e conduzimos ensaios em célula Vero infectada com TCT que não expressam a P21.

Nestes experimentos demonstramos pela primeira vez a correlação direta entre a P21 e a replicação de amastigotas intracelulares. Observamos redução na taxa de proliferação de epimastigotas e atraso na progressão do ciclo celular, maioria dos parasitas que não expressam a P21 encontram-se na fase G1 e ainda mostraram uma taxa de invasão celular reduzida. No entanto, houve um maior número de amastigotas intracelulares por célula (maior taxa de multiplicação), sugerindo que a P21 é um regulador negativo de proliferação de amastigotas em células de mamíferos (Teixeira *et al.*, 2022).

Entretanto, apesar dos achados interessantes constatados com a forma recombinante da P21 e os parasitas que não expressam a P21, ainda temos algumas inquietações. Será que a P21 tem efeito sobre a taxa de invasão de maneira similar nas cepa G e Y? Quanto a taxa de multiplicação, será similar ou diferente? Será que a P21 tem efeito sob a taxa de eclosão ou na diferenciação de amastigotas em tripomastigotas? Será que esse efeito é similar nas diferentes linhagens? Será que é diferente de acordo com a forma infectiva utilizada e a cepa a qual ela pertence? Perante essa inquietude e aliado ao fato dos achados observados com os parasitas que não expressam a P21 terem sido conduzidos com as formas tripomastigotas metacíclicas (TM) da cepa Y. Quisemos testar o impacto da P21 em modelo *in vitro* e *in vivo*, recorrendo as formas tripomastigotas de cultura em tecido que não expressão a P21 infectando linhagens celulares distintas.

Cientes que as cepas de *T. cruzi* tem demonstrado diferentes resultados em experimentos *in vitro* e *vivo*. Conforme, referido anteriormente, as cepa G e Y são consideradas cepas polares, a cepa G é considerada “pouco virulenta” e a cepa Y muito virulenta. No entanto, esse achado clínico variam de acordo com o hospedeiro (conforme abordado no subcapítulo 1.4 e 1.5). Também é sabido que a forma TM da cepa G apresentam baixa infectividade *in vitro* e não apresentam parasitemia *in vivo*. No entanto, as amastigotas da cepa G são altamente infectivas *in vitro* e não mantêm parasitemia patente *in vivo*. Mas em um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa observamos parasitemia sistêmica patente em camundongos da linhagem C57BL/6 nocaute INF γ (C57BL/6 INF $\gamma^{-/-}$) (Rodrigues *et al.*, 2012b), sustentando mais os achados referidos na literatura quanto a variação do parasitismo dependendo do hospedeiro. Por isso, conduzimos a presente pesquisa para melhor compreensão os impactos da P21 nos processos de invasão e multiplicação do parasita e o impacto que esses conhecimentos podem ter na prospecção de novas formas terapêuticas para a doença.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Avaliar o efeito do silenciamento do gene da P21 de *Trypanosoma cruzi* nas cepas G e Y empregando modelo experimental *in vitro* tendo como células hospedeiras as linhagens celulares Vero e C2C12 e *in vivo* com a utilização de modelo murino de infecção experimental.

2.2. ESPECÍFICOS

1. Quantificar a taxa de invasão celular em ambas linhagens celulares infectadas com parasitas que não expressam a P21 e parentais da cepa G e Y
2. Quantificar a taxa de multiplicação de amastigotas intracelulares ao longo da cinética de tempo (24, 48, 72 e 96 horas pós-infecção) *in vitro*
3. Quantificar a carga parasitária por qPCR ao longo da cinética de tempo (24, 48, 72 e 96 horas pós-infecção) *in vitro*
4. Quantificar a taxa de eclosão de tripomastigotas de cultura de tecidos e amastigotas ao longo da cinética de tempo (72horas, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 horas pós-infecção) *in vitro*
5. Quantificar a parasitemia sistêmica comparando o controle (não infectado), parientais e TcP21^{-/-} em camundongos C57BL/6 INF γ ^{-/-} infectados pela cepa G e BALB/c infectados pela cepa Y
6. Quantificar por qPCR a carga parasitária no tecido cardíacos de animais infectados
7. Analisar as alterações histopatológicas (infiltrado inflamatório, ninhos de amastigotas, número de vasos sanguíneos e fibrose) no tecido cardíaco de animais infectados

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. CULTURAS CELULARES E PARASITAS

Os ensaios *in vitro* foram conduzidos em célula Vero (proveniente de fibroblasto de rim de macaco Africano verde, *Cercopithecus aethiops*) e C2C12 (mioblasto do tecido muscular de camundongos), essas células foram obtidas no instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. Os parasitas utilizados para infecção experimental, da cepa G (DTU TcI) foram isolados de Gambá (*Didelphis marsupialis*), no estado de Amazonas, Brasil, (número de acesso no GenBank: AF239981) e os da cepa Y (DTU TcII) foram isolados originalmente de Humano (*Homo sapiens*), no estado de São Paulo, Brasil (número de acesso no GenBank: AF301912).

As culturas celulares de célula Vero e tripomastigotas de cultura em tecidos foram mantidas em meio Meio Eagle Modificado por Dulbecco, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium/high glucose - Cultilab) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB; Invitrogen, New York, U.S.A.), 1% de penicilina, estreptomocina e antimicótico (LGC Biotecnologia, Brasil) e mantidos em estufa umedecida a 37°C e 5%CO₂

3.1.2. Obtenção das formas tripomastigotas de cultura de tecido que não expressam a P21 da cepa G e Y

Culturas de epimastigotas em fase estacionária contendo tripomastigotas metacíclicos do parentais (expressam a proteína Cas9) e que não expressam a proteína P21 (TcP21^{-/-}) da cepa G (Rodrigues, 2022) e Y (Teixeira *et al.*, 2022) foram utilizadas para infectar célula Vero a fim de obter os tripomastigotas derivados de tecidos (TCT) para os experimentos *in vitro* e *in vivo*.

3.2. ANIMAIS E ÉTICA

Os experimentos *in vivo* foram realizados em camundongos da linhagem C57BL/6 nocaute a INF γ (C57BL/6 INF γ ^{-/-}) infectados com parasitas nocaute a P21 (cepa G Tc P21^{-/-}) e parasitas parentais cepa G. Os parasitas da cepa Y, nocaute a P21 (cepa Y Tc P21^{-/-}) e parentais foram inoculados em camundongos BALB/c. A utilização dos animais neste estudo foi aprovada pela CTNBio para utilização de organismos geneticamente modificados com número de processo: 01245.004217/2023-83 e número de extrato: 8739/2023 (vide Anexo I).

Os animais foram mantidos em instalações da Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia de acordo com as normas vigentes. Camundongos da linhagem C57BL/6 e BALB/c machos com seis a oito semanas de idade foram mantidos sob condições padrão em um ciclo claro-escuro de 12 horas em um ambiente com temperatura controlada (25°C), com comida e água *ad libitum*. A manutenção e os cuidados com os animais obedeceram às orientações do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA, Anexo II). A eutanásia animal foi realizada com base em critérios de bem-estar internacional, de acordo com a Associação Médica Veterinária Americana.

3.3. CONFIRMAÇÃO DO NOCAUTE POR PCR CONVENCIONAL

Antes de conduzir os experimentos foi realizada a confirmação da não expressão da P21 nos parasitas através da PCR convencional, onde inicialmente foi realizada a coleta de parasitas no sobrenadante contendo TCT de culturas celulares de célula Vero Tc P21^{-/-}, da cepa G e Y isoladamente, o mesmo foi feito para os parasitas parientais. Foi realizada a lavagem dos parasitas com PBS 1 x. Seguidamente, foi realizada a extração do DNA dos parasitas de acordo com método descrito por Teixeira *et al.* (2015).

Antes da realização da PCR convencional foi realizada a dosagem do DNA parasitário em espectrofotometro (Thermo Fisher Nanodrop 3300; Wilmington, U.S.A.). Na reação da PCR foi adicionado 12,5µL master Mix (Promega Corporation, Madison, U.S.A), 1 µL de cada primer P21 UTR Fw e Rv (descritos na **Tabela 1**) e 1µL de DNA do parasita e 9,5µL de água DNA e RNA free para perfazer um volume total de 25µL.

Amplificação foi realizado no termociclador (Eppendorf Mastercycler®) e programado de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos com desnaturação a 95 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento 58 °C (calculada de acordo com a temperatura de melting dada pelo fabricante dos dois pares de iniciadores) por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 5 minutos. eletroforese correu a 90V por cerca de 60 minutos em gel de agarose 1,5%, no tampão de corrida TBE (Tris, Ácido bórico e EDTA) [0,5x]. O gel foi corado com 5 µL de SYBER® Safe (Applied Biosystems®) para cada 100 mL de tampão e as imagens foram adquiridas utilizando o sistema de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia®).

Tabela 1. Primers utilizados para confirmação de nocaute a P21 e qPCR.

	Primers	Amplicon	Gene ID (EMBL)	Ref. PMID
1	P21 UTR Fw GATACAACCACAAGGAGCC	392 pb	EU004207	1599057
2	P21 UTR Rv TTAAGTGGCGTCTGTGGAATC			
3	Diaz7 CGCAAACAGATATTGACAGAG	195 pb	DNA	35252026
4	Diaz8 TGTTACACACTGGACACCAA		Satellite	

3.4. EXPERIMENTOS DE INVASÃO

Em placa de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm foram cultivadas 5×10^4 e 3×10^4 de célula Vero e C2C12 por poço e deixada na estufa úmida a 37°C e 5% de CO_2 overnight, posteriormente estas foram infetadas por formas tripomastigotas de cultura em tecido (TCT) em um MOI (multiplicidade de infecção) de 5:1 para o parasitas da cepa G parentais e o mesmo foi feito para os parasitas Cepa G Tc P21^{-/-}. O mesmo foi feito para os parasitas parentais e nocaute a P21 da cepa Y. As placas foram levadas à estufa durante 2 horas para os parasitas invadirem, passado esse tempo, lavou-se cada poço com PBS 1x (pH 7,2) 3 vezes para remover os parasitas que não invadiram.

As lamínulas contendo células infetadas foram fixadas com Bouin's durante 15 minutos e coradas com solução de Giemsa puro durante 30 minutos. Depois foram descoradas em solução de concentração decrescente de acetona e crescente de Xilol, deixadas secar e por fim foram montadas em lâminas contendo meio de montagem (permount; Fisherbrand™ Permount™ Adhesive; Fisher scientific; New Jersey; U.S.A.). As imagens foram capturadas no microscópio invertido de captura de imagens (Nikon Eclipse TS100 Trinocular Inverted Microscope; Tokyo; Japão) na objetiva de 20x, foi realizada a contagem de 300 células totais e número de parasitas que invadiram com recurso ao software Image J.

3.5. MULTIPLICAÇÃO DE AMASTIGOTAS INTRACELULARES POR COLORAÇÃO COM GIEMSA

A multiplicação de amastigotas intracelulares foi avaliada por meio de ensaio de coloração com Giemsa. Para tal, em placa de 24 poços contendo lamínulas circulares (13mm) foram plaqueadas 5×10^4 células Vero ou C2C12 por poço e levadas a estufa úmida overnight. Seguidamente, as células foram infetadas por TCT da cepa G parentais e Tc P21^{-/-} num MOI de 5:1. Após, 2 horas foram removidos por meio de lavagens com PBS 1x 3 vezes os parasitas que

não invadiram e colocado meio DMEM suplementado com soro fetal bovino e deixou-se os parasitas a multiplicarem de acordo com a seguinte cinética de tempo 24, 48, 72 e 96 horas.

Ao fim de cada tempo, após lavagem com PBS 1x três vezes, as células foram fixadas com metanol P.A. gelado durante 15 minutos e seguidamente coradas com solução de Giemsa puro por 30 minutos. Após várias lavagens com PBS 1x, deixou-se as lamínulas a secarem com a porção da célula voltada para cima em papel absorvente e posteriormente, com a porção da célula voltada para baixo foram montadas em lâminas contendo meio de montagem (permount; Fisherbrand™ Permount™ Adhesive; Fisher scientific; New Jersey; U.S.A.).

As imagens foram capturadas no microscópio Nikon, objetiva 20x, e a contagem de células infetadas e números de parasitas foi realizada com auxílio do software Image J. Na contagem foram considerados os seguintes parâmetros:

1. Percentagem de células infetadas em 10 campos: foram contadas o total de células existentes e as células infetadas em cada campo e por lamínula.
2. Número de parasitas em 300 células infetadas por lamínula.

3.6. QUANTIFICAÇÃO DE AMASTIGOTAS INTRACELULARES EM CULTURA CELULAR POR qPCR

A quantificação do DNA parasitário intracelular por qPCR foi realizada com recurso ao ABI Prism 7500 Fast System (Applied Biosystems, Foster City, CA) em um volume final de 10 µL contendo 4 µL de DNA parasitário, 5 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 1 µL do par de primers Diaz 7 e Diaz 8 (Diaz et al., 1992).

Primeiramente, em placa de 6 poços foram plaqueadas 5×10^4 células/poço (Vero ou C2C12), 24 horas depois a infeção foi realizada considerando o MOI de 5:1 conforme descrito anteriormente. Deixou-se os parasitas a multiplicarem de acordo com a seguinte cinética de tempo 24, 48, 72 e 96 horas.

Ao fim de cada tempo, após lavagem com PBS 1x, três vezes, foi aplicada tripsina e as placas levada a estufa úmida de CO₂ por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado meio DMEM completo (10% de soro fetal bovino) e a solução foi homogeneizada vigorosamente até as células ficarem individualizadas. E lavadas com PBS 1X, foi normalizada a quantidade de célula em todos os tempos para 1×10^5 seguidamente, foi realizada a extração de DNA conforme descrito por Teixeira *et al.* (2015). Após a quantificação do DNA com auxílio de um nanodrop

foi normalizada a quantidade de DNA para 100ng em toda cinética de tempo a ser utilizada na reação.

A curva padrão dos resultados do qPCR foi obtida utilizando diluições seriadas de 100 ng de DNA extraído de epimastigotas da cepa G (DTU TcI), com limite de detecção de 0,0001 fg, conforme proposto por Diaz *et al.* (1992) e modificado por De Oliveira et al. (2020b). Foram utilizados controles internos positivos, negativos e reagentes em todas as reações de qPCR.

Após realizar o plaqueamento, mix da reação (4 µL de DNA parasitário e 5 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix e 1 µL de prime Diaz 7 e Diaz 8 (**Tabela 1**) a amostra foram centrifugadas a 400g por 2 minutos. A qPCR foi realizada nas seguintes condições: 50 °C, 2minutos; 95 °C, 10minutos; 95 °C, 15 segundos; 60 °C, 1 minuto; 95 °C, 15 segundos; 60 °C, 1 minuto e 95 °C 15 segundos.

3.7. EXPERIMENTOS DE ECLOSÃO

A eclosão dos TCT de parasitas parentais e TcP21^{-/-} foi realizada em placa de 6 poços, onde inicialmente foi cultivada 5x10⁴ por poço de célula Vero ou C2C12, procedeu-se conforme descritos nos ensaios descritos anteriormente. E a partir das 72 horas foi recolhido o sobrenadante em cada poço e foram aplicadas 10µL em uma câmara de Neubauer e coberta com lamínulas retangulares 18mm. A contagem de tripomastigotas e amastigotas foi realizada com auxílio de um microscópio ótico composto binocular (Nikon eclipse E100 LED MVR, Tokyo, Japão) na objetiva de 40x. A contagem foi realizada até as 240 horas pós-infecção e o número de tripomastigotas/amastigotas no sobrenadante foi calculado multiplicando o fator de diluição e correção da Neubauer (10⁴).

3.8. INFECÇÃO EXPERIMENTAL *in vivo*

Os camundongos da linhagem C57BL/6 INFγ^{-/-} e BALB/c foram randomizados em três grupos, separadamente e cada grupo era composto por 5 animais. Em cada linhagem de animais, dois grupos eram de animais infectados (parasitas parentais e Tc P21^{-/-}) e um grupo de animais não infetados.

Os camundongos C57BL/6 INFγ^{-/-} foram infectados com parasitas da cepa G pois trata-se de uma cepa não virulenta e que não causa parasitemia patente em diferentes modelos experimentais murinos. Em estudo anterior utilizado em camundongos nocautes para várias

citocinas e infectados com as formas amastigotas extracelulares da cepa G foi observada parasitemia sistêmica patente nos camundongos da linhagem C57BL/6 nocaute para o $\text{INF}\gamma$ (Rodrigues *et al.*, 2012b).

Posteriormente, os animais foram inoculados por via subcutânea com 10^5 TCT da cepa G e Y de *T. cruzi*. Do 3º dia pós-infecção e de forma alternada até ao 15º dia foram coletadas amostras de sangue para a quantificação da parasitemia sistêmica. No 15º dia pós-infecção, os animais foram eutanasiados sob anestesia inalatória (Isoforine; princípio ativo: Isoflurano 1mL/mL; Itapira, São Paulo; Brasil) e o coração foi coletado dividido em duas partes. Uma das partes que foi utilizada para a análise histopatológica, foi incluída em formaldeído P.A e 24 horas depois passada para solução de álcool 70%. A outra parte do coração, utilizada para quantificação do DNA parasitário por qPCR, foi incluída em nitrogênio líquido e conservada à -80 no ultrafreezer.

3.8.1. Quantificação da parasitemia sistêmica em camundongos C57BL/6 $\text{INF}\gamma^{-/-}$ e BALB/c

Para estimar a parasitemia foram coletados 5 μL de sangue, obtidos por punção venosa da cauda dos camundongos, e as tripomastigotas sanguíneas coletadas em ambas linhagens de camundongos (C57BL/6 $\text{INF}\gamma^{-/-}$ e BALB/c) foram contados em câmara de Neubauer. Os dados foram plotados como o número de tripomastigotas/parasitas por microlitro de sangue. A parasitemia foi avaliada diariamente a partir do 3º ao 15º dia pós infecção.

3.8.2. Quantificação do DNA de *T. cruzi* no tecido cardíaco por qPCR

A quantificação do DNA de *T. cruzi* foi realizada conforme descrito no item 3.5, a pós a extração de DNA do tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 $\text{INF}\gamma^{-/-}$ e BALB/c. No entanto, no caso dos experimentos *in vivo*, inicialmente os camundongos foram eutanasiados e os corações coletados e pesados para padronização de 100mg de tecido e armazenado em nitrogênio líquido. Em seguida, os corações foram macerados com o auxílio de um cadinho de porcelana e adicionado 500 μL de tampão NLB, 16 μL de SDS 10% e 8 μL de solução proteínase K. As amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C overnight.

Após a adição de 150 μL do tampão NaCl 6M e agitar as amostras com recurso ao vórtex por 15 segundos, as amostras foram acondicionadas em gelo por 10 minutos e depois

centrifugadas a 12000 rpm durante 25 min. Posteriormente, recolheu-se o sobrenadante e adicionou-se 800 µL de etanol absoluto à solução, misturou-se por inversão e centrifugou-se as amostras a 12000 rpm por 15 min. Depois de descartar o sobrenadante e lavar o pellet com 1 mL de solução de etanol a 75%, centrifugou-se as amostras a 12000 rpm por 5 min e descartou-se o sobrenadante e foram deixadas a secar por 10 min e finalmente ressuspendeu-se o pellet com 15-200 µL de água destilada RNA e DNA free (Introgen, New York, U.S.A.) é feita a dosagem do DNA com auxílio ao nanodrop e a quantidade de DNA foi normalizada para 200ng por amostra.

3.8.3. Análise histopatológica do tecido cardíaco em coloração HE

Foi realizada também a análise histopatológica do tecido cardíaco a fim de avaliar a formação de ninhos de amastigotas e infiltração linfocitária através de coloração de Hematoxilina e eosina (HE). As amostras de coração foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10%, desidratadas em solução de etanol, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina. Blocos contendo corações foram seccionados em seções de 5µm de espessura e, em seguida, colocados em lâminas de vidro e corados (Martins et al., 2020). O infiltrado inflamatório e o dano tecidual foram pontuados conforme descrito por Da Silva et al. (2018) pela intensidade: (-) ausente, (+) leve, (++) moderado, (+++) intenso.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism versão 8.0.1. Os dados expressados com média ± erro padrão (E.P) todos os experimentos *in vitro* foram realizados em triplicata técnica e biológica. Os parasitas parentais de ambas cepas (G e Y) foram considerados como controles e os que não expressam (nocautes) a P21 como teste, nos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

In vitro foram conduzidos experimentos em célula Vero e C2C12 infectadas com TCT que não expressam a P21 e parentais da cepa G e Y de forma independente. Nos experimentos *in vivo* os camundongos da linhagem C57BL/6 INFγ^{-/-} (nocaute ao interferon gamma) foram infectados com TCT da cepa G, e os da linhagem BALB/c foram infectados com TCT da cepa Y.

A análise comparativa dos dados foi realizada comparando os parasitas controle (parental) com os que não expressam a P21 separadamente de acordo com a linhagem celular utilizada e com as duas diferentes cepas de parasitos. Nos experimentos in vivo os resultados obtidos da parasitemia sistêmica, quantificação do DNA parasitário por qPCR e alterações histopatológicas foram analisados separadamente por linhagem de camundongos.

Inicialmente, todos os dados foram verificados quanto à distribuição normal dos dados pelo teste de Shapiro Wilk. Nos experimentos de invasão e quantificação do DNA do parasita por qPCR no tecido cardíaco as diferenças significativas foram determinadas pelo teste T e a comparação das amostras independentes foi realizada pelo teste de Mann-Whitney.

As diferenças estatísticas nos experimentos de multiplicação (coloração com Giemsa e qPCR), eclosão e parasitemia sistêmica foram determinadas pelo two way ANOVA e as comparações múltiplas pelo teste de Bonferroni, para dados paramétricos e o teste Sidak's para os não paramétricos. Em todas as análises foi considerado o valor $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTAÇÃO *in vitro* EM CÉLULA VERO E C2C12

4.1.1. Invasão e multiplicação de amastigotas intracelular em célula Vero e C2C12 infectadas com parasitas da cepa G

Face às evidências observadas em ensaios realizados com P21 recombinante, foi proposta a condução de experimento de invasão, multiplicação e eclosão a fim de avaliar o efeito da P21, com recurso a parasitas que não expressam a P21. Os experimentos foram conduzidos em célula Vero e C2C12, conforme referido no capítulo de materiais e métodos.

Os resultados conforme ilustrado na **figura 7A e 7B**, indicam que os parasitas TcP21^{-/-} invadiram significativamente menos as células hospedeiras Vero (<0,0020) e C2C12 (<0,001). Esses resultados são referentes aos ensaios realizados com parasitas da cepa G (DTU TcI).

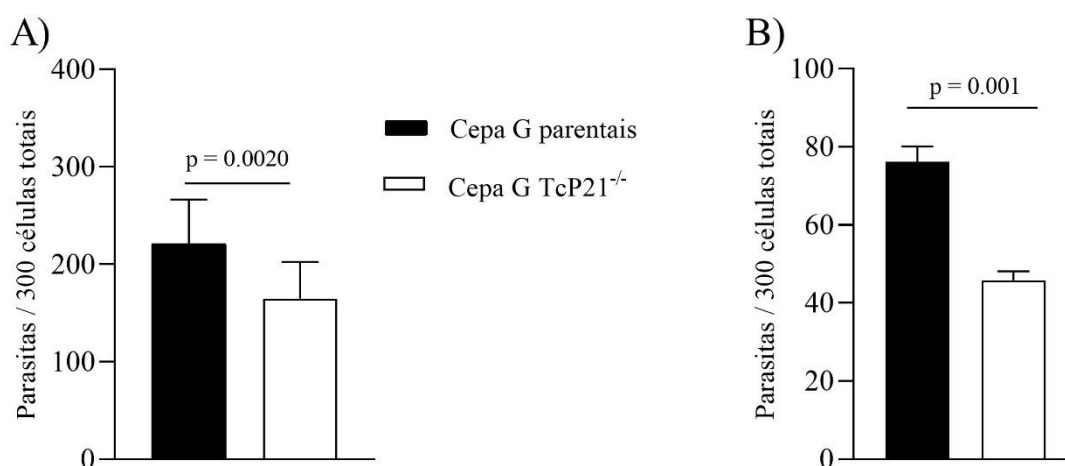


Figura 7. Invasão celular de parasitas da cepa G de *T. cruzi* TcP21^{-/-} e parentais na linhagem celular Vero e C2C12. (A) Número de parasitas que invadiram a célula hospedeira em 300 células totais na linhagem celular Vero; (B) Número de parasitas que invadiram a célula hospedeira em 300 células totais na linhagem celular C2C12. Observou-se que os parasitas da cepa G TcP21^{-/-} apresentaram significativamente menor capacidade de invasão em ambas linhagens celulares. Todos os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.1, o gráfico mostra a média \pm EP dos experimentos realizados em triplicata. A comparação dos dados de invasão entre os parasitas TcP21^{-/-} e parentais foi realizada por meio do teste T e teste de Mann-Whitney para comparação das amostras independentes considerando o valor de $p < 0,05$ como sendo estatisticamente significativo.

Quanto a multiplicação, avaliando a porcentagem de células infectadas com parasitas da cepa G observamos que ao longo da cinética de tempo de 24, 48, 72 e 96 horas os parasitas TcP21^{-/-} infectaram significativamente menos a célula hospedeira Vero em relação aos parasitas parentais, conforme ilustrado na **Figura 8A**. No caso em que a célula C2C12 foi

utilizada como a célula hospedeira, observou-se também menor porcentagem de células infectadas com parasitas que não expressam a P21 em relação aos parasitas controle, no entanto, essa diferença foi significativamente menor apenas no tempo de 48 horas ($<0,0467$), conforme ilustrado na **Figura 8B**.

Avaliando o número de parasitas em 300 células infectadas por parasitas da cepa G, observamos em célula Vero e C2C12 quantidade similar de amastigotas intracelulares ao longo da cinética de tempo (24, 48, 72 horas) entre os parasitas *TcP21^{-/-}* e os controles, conforme ilustrado na **Figura 8C** e **8D**. Porém, no tempo de 96 horas, apenas na célula Vero, a quantidade de amastigotas intracelulares foi significativamente menor ($<0,0001$) nos parasitas nocautes a P21 em comparação aos controles (**Figura 8C**).

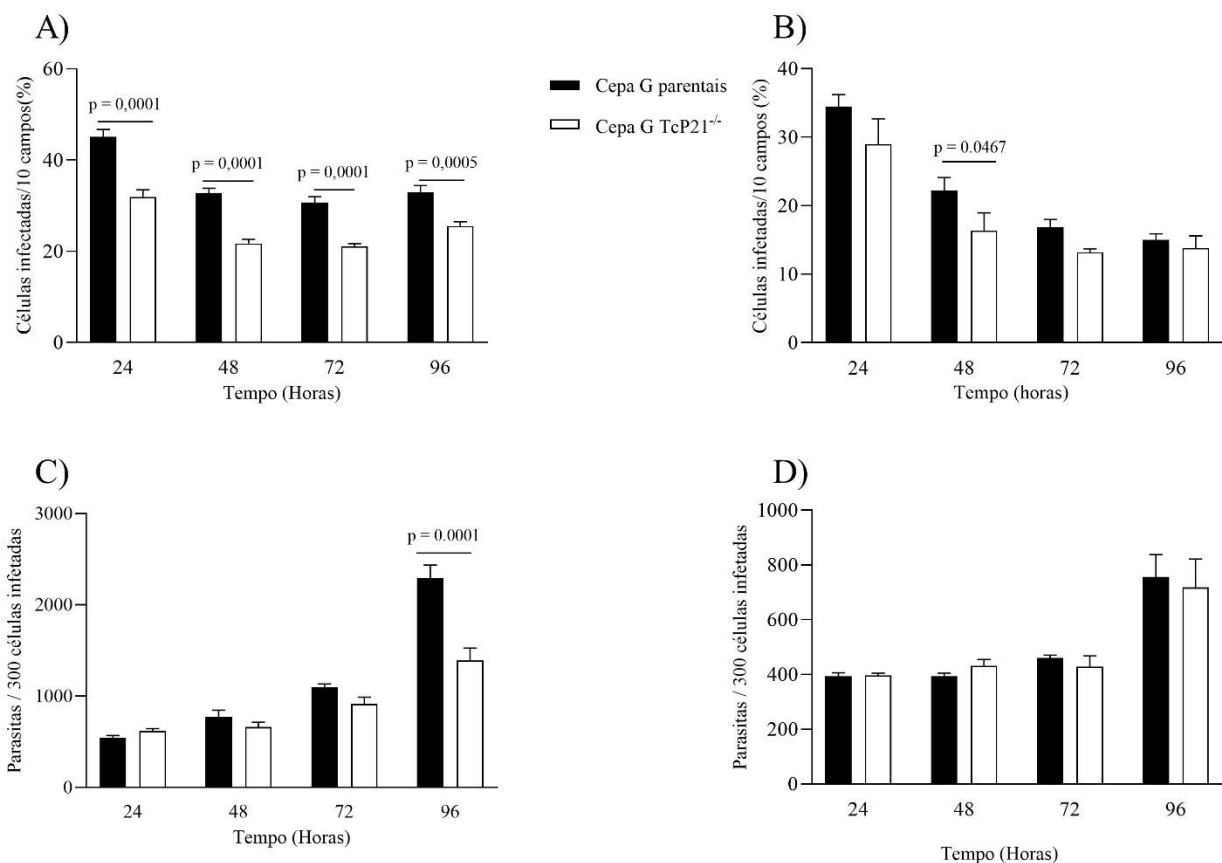


Figura 8. Multiplicação intracelular de parasitas da cepa G de *T. cruzi* *TcP21^{-/-}* e parentais na linhagem celular Vero (A e C) e C2C12 (B e D). (A) Porcentagem de células Vero infectadas em 10 campos aleatórios; (B) Porcentagem de células C2C12 infectadas em 10 campos aleatórios. (C) Número de parasitas intracelulares em 300 células da linhagem Vero infectadas. (D) Número de parasitas intracelulares em 300 células da linhagem C2C12 infectadas. Todos os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.1, o gráfico mostra a média \pm EP dos experimentos realizados em triplicata. As diferenças estatísticas de multiplicação intracelular entre os parasitas *TcP21^{-/-}* e parentais utilizando teste T e teste de Mann-Whitney para comparação múltipla foram determinadas por ANOVA bidirecional e teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Em todas as análises o valor de $p < 0,05$ foi estatisticamente significativo.

4.1.2. Invasão e multiplicação de amastigotas intracelular em célula Vero e C2C12 com a cepa Y

Ao avaliar invasão celular em ambas linhagens celulares (Vero e C2C12) infectadas com parasitas da cepa Y (DTU TcII), observamos na linhagem celular Vero que os parasitas TcP21^{-/-} apresentaram uma tendência de invadir mais as células hospedeiras sem diferença estatística (**Figura 9A**). No entanto, na linhagem celular C2C12, os parasitas que não expressam a P21 invadiram significativamente menos (<0,0440) a célula hospedeira em relação aos parasitas controle (**Figura 9B**).

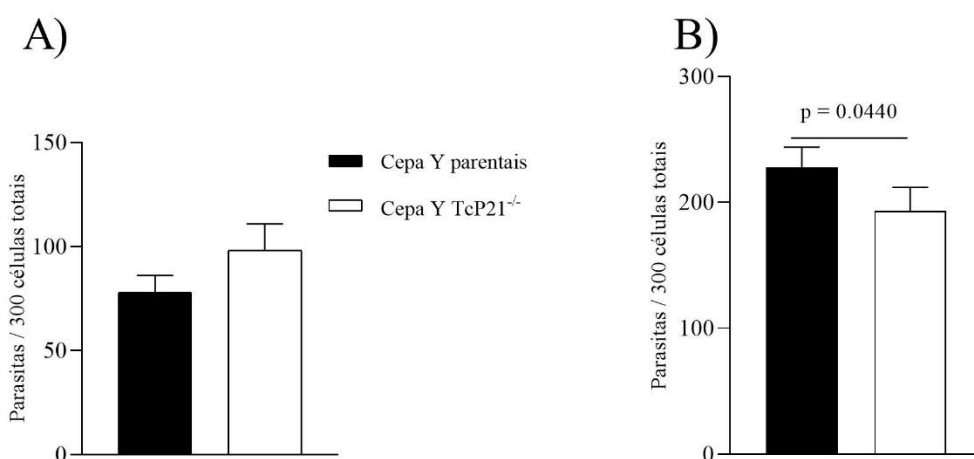


Figura 9. Invasão celular de parasitas da cepa Y de *T. cruzi* TcP21^{-/-} e parentais na linhagem celular Vero e C2C12. (A) Número de parasitas que invadiram a célula hospedeira em 300 células totais na linhagem celular Vero; (B) Número de parasitas que invadiram a célula hospedeira em 300 células totais na linhagem celular C2C12. Observou-se que os parasitas da cepa Y TcP21^{-/-} apresentaram significativamente menor capacidade de invasão na linhagem celular C2C12 (<0,0440). Todos os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.1, o gráfico mostra a média ± EP dos experimentos realizados em triplicata a comparação dos dados de invasão entre os parasitas TcP21^{-/-} e parentais foi realizada por meio do teste T e teste de Mann-Whitney para comparação das amostras independentes considerando o valor de p<0,05 como sendo estatisticamente significativo.

A multiplicação intracelular foi controversa em ambas linhagens celulares. Na célula Vero observamos uma tendência dos parasitas TcP21^{-/-} de maior porcentagem de células infectadas em relação aos parasitas controle (**Figura 10A**) ao longo da cinética de tempo (24, 48,72 e 96 horas). Estando de acordo com o achado observado nos experimentos de invasão. Nos quais observamos maior tendência de os parasitas TcP21^{-/-} invadirem mais a célula hospedeira. Na linhagem C2C12 observamos que os parasitas nocautes para P21 apresentaram ao longo da cinética de tempo menor porcentagem de células infectadas em relação aos parasitas controle e no tempo de 72 horas essa diferença foi significativa (<0,0071), conforme ilustrado na **Figura 10B**.

Quanto ao número de amastigotas intracelulares observamos que os parasitas que não expressam a P21 apresentaram no tempo de 48 horas números significativamente maiores ($<0,0151$) de amastigotas intracelulares em relação aos parasitas parentais, conforme ilustrado na **Figura 10C** em célula Vero. Na linhagem celular C2C12 observamos ao longo da cinética de tempo aumento gradual do número de amastigotas intracelulares sendo essa quantidade similar em ambos parasitas (TcP21^{-/-} e os parentais) no tempo de 24, 48 e 72 horas mas as 96 horas observamos maior quantidade de amastigotas intracelulares nos parasitas TcP21^{-/-} em comparação ao parasitas controles embora essa diferença não tenha demonstrado estatística (**Figura 10D**).

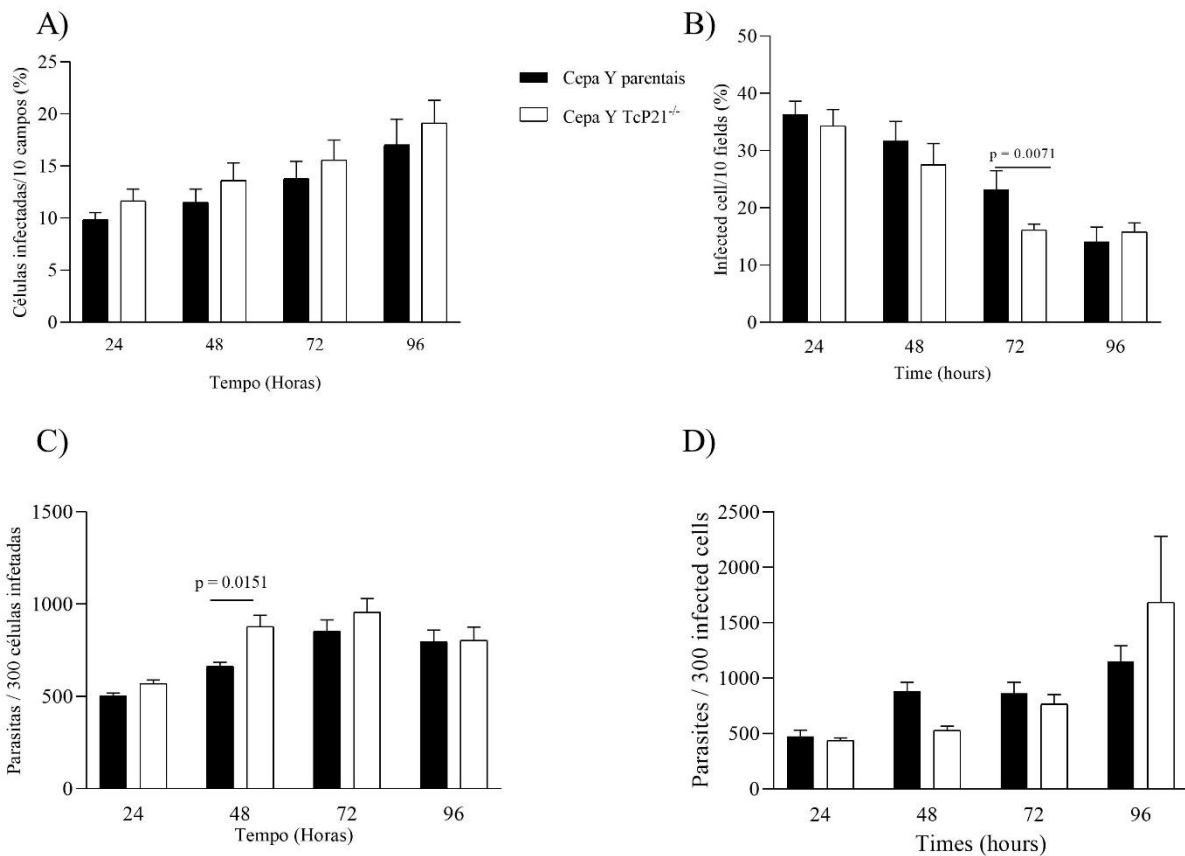


Figura 10. Multiplicação intracelular da cepa Y de *T. cruzi* TcP21^{-/-} e parentais na linhagem celular Vero e C2C12. (A) Porcentagem de células Vero infectadas em 10 campos aleatórios; (B) Porcentagem de células C2C12 infectadas em 10 campos aleatórios. (C) Número de parasitas intracelulares em 300 células da linhagem Vero infectadas. (D) Número de parasitas intracelulares em 300 células da linhagem C2C12 infectadas. Todos os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.1, o gráfico mostra a média \pm SEM dos experimentos realizados em triplicata. As diferenças estatísticas de multiplicação intracelular entre os parasitas TcP21^{-/-} e parentais foram determinadas por ANOVA bidirecional e teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Em todas as análises o valor de $p < 0,05$ foi estatisticamente significativo.

4.1.3. Determinação da carga parasitária de experimento *in vitro* por qPCR

Quantificamos a carga parasitária ao longo da cinética de tempo de 24, 48, 72 e 96 horas *in vitro* em célula Vero e C2C12. Em célula Vero, observamos quantidade de DNA de *T. cruzi* da cepa G significativamente menor nos parasitas TcP21^{-/-} no tempo de 24 horas (<0,0024), 48 horas (0,0056) e de 96 horas (<0,0047), conforme ilustrado na **Figura 11A**.

Em célula C2C12 observamos menor quantidade de DNA de *T. cruzi* nos parasitas que não expressam a P21 ao longo de toda a cinética de tempo, sendo que somente no tempo de 72 a diferença foi significativa (<0,0109), **Figura 11B**. No entanto, os achados constatados na qPCR de uma forma geral assemelham-se aos observados nos ensaios de multiplicação com coloração de Giemsa. Pois os parasitas que não expressam a P21 multiplicaram menos e na qPCR detectamos menor quantidade de DNA de *T. cruzi*.

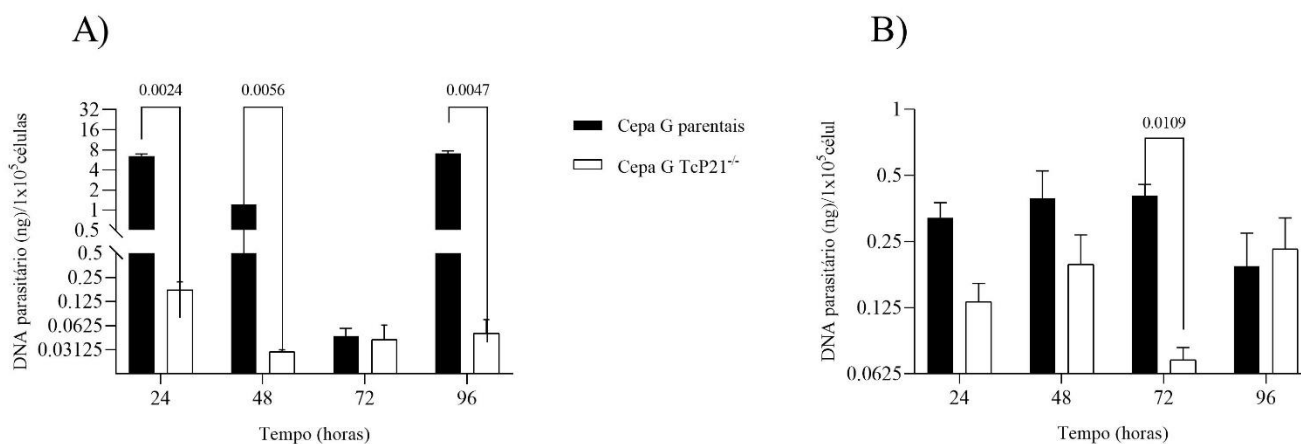


Figura 11. Carga parasitária por qPCR na cinética do tempo de experimentos *in vitro* nas linhagens celular Vero e C2C12 infectada com parasitas da cepa G. A) Quantidade de DNA parasitário da cepa G parasitas controle (parentais) e nocaute a P21 (TcP21^{-/-}) em célula Vero. Observamos quantidade de DNA significativamente menor no tempo de 24 e 96 horas. B) Quantidade de DNA parasitário da cepa G parasitas parentais e TcP21^{-/-} em célula C2C12. Valores do eixo Y apresentados em escala log₂ e formato dos números antilog. Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism versão 8.0.1, o gráfico mostra a média ± EP de experimentos realizados em triplicata. As diferenças estatísticas da multiplicação intracelular foram determinadas por ANOVA bidirecional (efeito misto) e teste de Bonferroni para comparações múltiplas foi considerado o valor de p<0,05 como sendo estatisticamente significativo.

Ao avaliarmos a quantidade de DNA de *T. cruzi* em célula Vero e C2C12 infectada com a cepa Y. Em célula Vero não conseguimos obter os resultados pois, a cultura de parasitas contaminou durante o período experimental. Em célula C2C12 observamos maior quantidade de DNA de *T. cruzi* nos parasitas TcP21^{-/-} em relação aos parentais e no tempo de 72 horas essa diferença demonstrou-se significativa (<0,0186), conforme ilustrado na **Figura 14**.

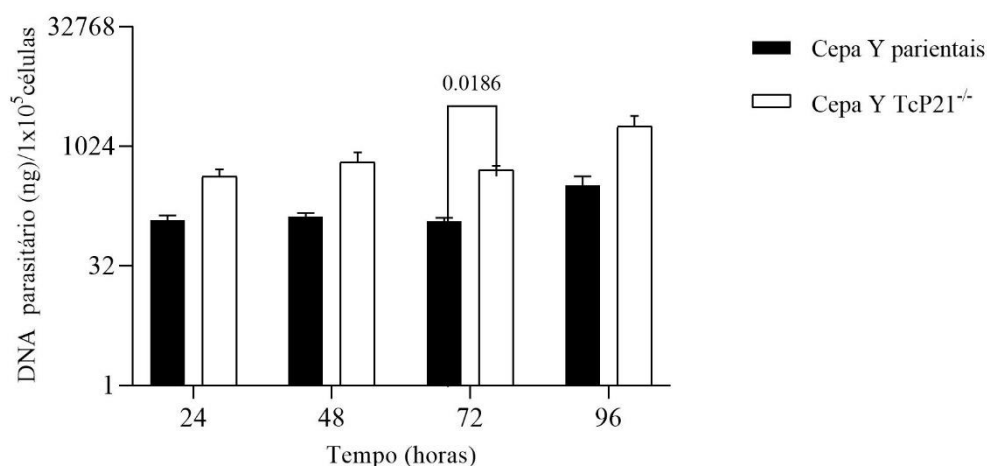


Figura 12. Carga parasitária por qPCR na cinética do tempo de experimentos *in vitro* nas linhagens celular C2C12 infectada com parasitas da cepa Y. Observamos maior quantidade de DNA parasitário nos parasitas que não expressam a P21 e demonstrou-se significativo as 72 horas (0,0186). Os valores do eixo Y apresentados em escala log2 e formato dos números antilog. Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism versão 8.0.1, o gráfico mostra a média \pm EP de experimentos realizados em triplicata. As diferenças estatísticas da multiplicação intracelular foram determinadas por ANOVA bidirecional (efeito misto) e teste de Bonferroni para comparações múltiplas foi considerado o valor de $p < 0,05$ como sendo estatisticamente significativo.

4.1.4. Taxa de eclosão de tripomastigotas e amastigotas em célula Vero e C2C12 infectadas com parasitas da cepa G

Realizamos também *in vitro* experimentos de eclosão em célula Vero e C2C12 infectadas com parasitas da cepa G. Em célula Vero, a partir das 168 horas a eclosão de tripomastigotas foi menor nos parasitas TcP21^{-/-}. Observamos significativamente menor taxa de eclosão de tripomastigotas de parasitas que não expressam a P21 a partir das 192 horas ($< 0,0008$), 216 horas ($< 0,0001$) e 240 horas ($< 0,0001$), **Figura 13A**. Quanto as amastigotas observamos significativamente maior taxa de eclosão as 240 horas ($< 0,0001$) em parasitas que não expressam a P21 (**Figura 13B**). Em célula C2C12, foi observada de forma significativa menor taxa de eclosão de tripomastigotas no tempo de 216 horas ($< 0,0051$) e 240 horas ($< 0,0001$) e menor taxa de eclosão de amastigotas as 216 horas ($< 0,0001$), conforme ilustrado na **Figura 13C e D**.

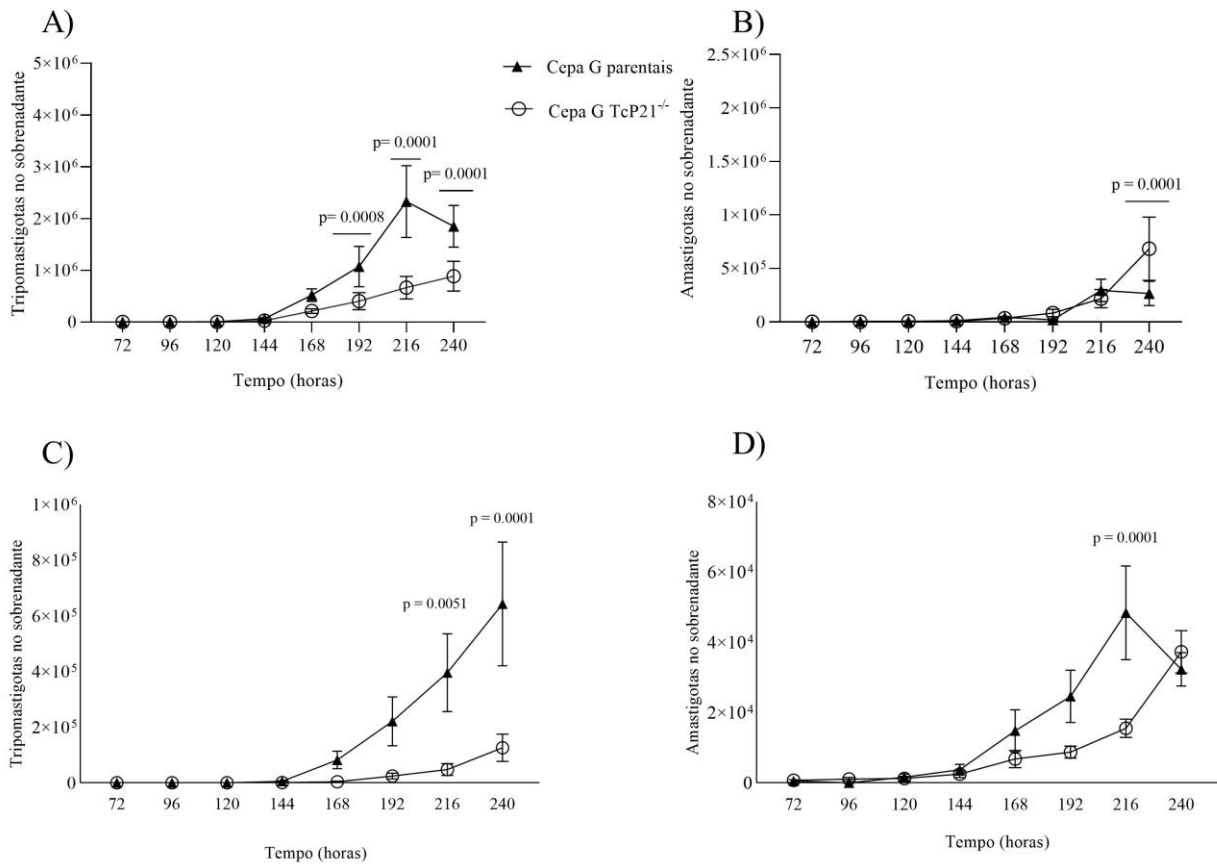


Figura 13. Ecloração de tripomastigotas e amastigotas em células Vero e C2C12 infectadas com parasitas da cepa G ao longo da cinética de tempo. (A e B) Tripomastigotas e amastigotas da cepa G TcP21^{-/-} e parasitas parentais eclodindo de células Vero; (C-D) Tripomastigotas e amastigotas da cepa G TcP21^{-/-} e parasitas parentais eclodindo de células C2C12. Os parasitas nocaute (TcP21^{-/-}) apresentaram taxa de ecloração significativamente maior de tripomastigotas a partir das 192 horas em 240 horas em célula Vero e das 216 horas em 240 horas em célula C2C12. A ecloração de amastigotas foi significativamente maior as 240 horas em células Vero infectadas e significativamente menor as 216 horas em célula C2C12 nos parasitas TcP21^{-/-}. Todos os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.1, o gráfico mostra a média ± SEM dos experimentos realizados em triplicata (A-D) Diferenças estatísticas de ecloração de tripomastigotas e amastigotas entre os parasitas TcP21^{-/-} e parentais foram realizados utilizando ANOVA de dois fatores e teste de Sidak para comparações múltiplas. Em todas as análises o valor de p<0,05 foi estatisticamente significativo.

4.1.5. Taxa de ecloração de tripomastigotas e amastigotas extracelulares em célula Vero e C2C12 infectadas com parasitas da cepa Y

Quanto a taxa de ecloração de tripomastigotas e amastigotas, em célula Vero infectada com parasitas da cepa Y (DTU TcII), observamos uma taxa de ecloração similar entre parasitos TcP21^{-/-} e parentais (**Figura 14A e B**). Em célula C2C12, observamos maior taxa de ecloração de tripomastigotas e amastigotas de parasitas que não expressam a P21. Porém, somente no tempo de 144 horas (<0,0444) observamos diferença estatística na taxa de ecloração de tripomastigotas em C2C12.

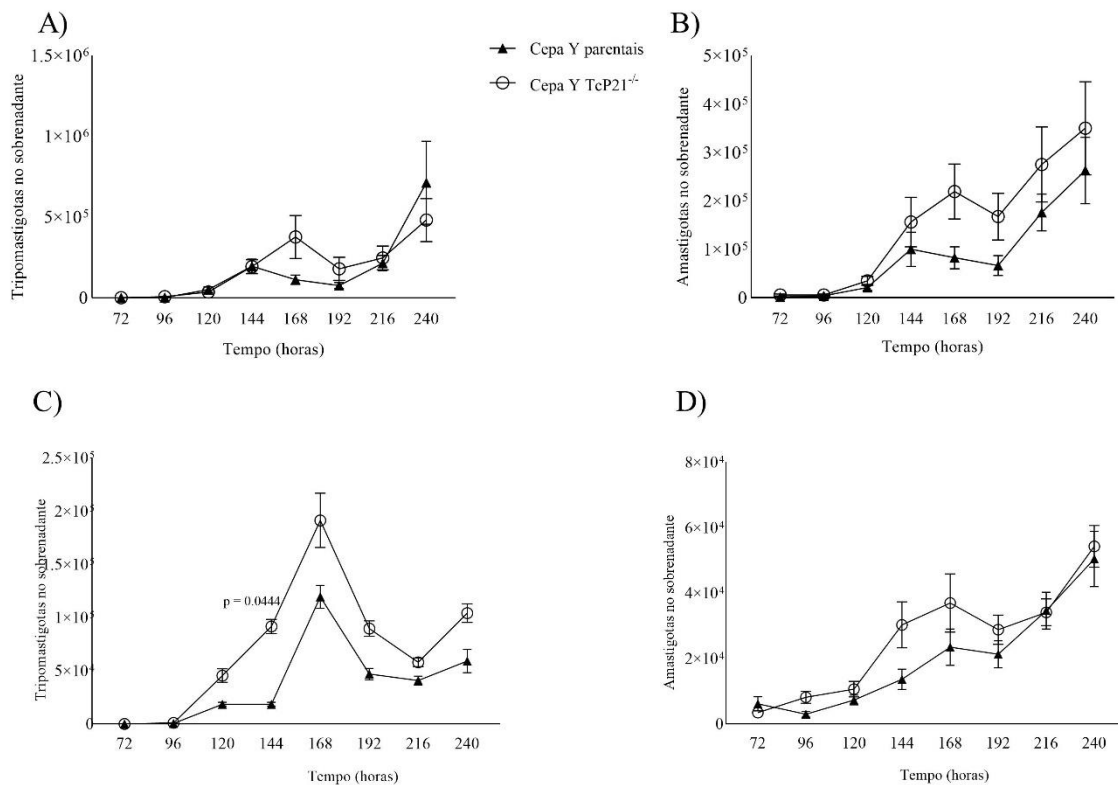


Figura 14. Eclusão de tripomastigotas e amastigotas em células Vero e C2C12 infectadas com parasitas da cepa G ao longo da cinética de tempo. (A e B) Tripomastigotas e amastigotas da cepa Y TcP21^{-/-} e parasitas parentais eclodindo de células Vero; (C-D) Tripomastigotas e amastigotas da cepa G TcP21^{-/-} e parasitas parentais eclodindo de células C2C12. Todos os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.1, o gráfico mostra a média ± SEM dos experimentos realizados em triplicata (A-D) Diferenças estatísticas de egresso de tripomastigotas e amastigotas entre os parasitas TcP21^{-/-} e parentais foram realizadas utilizando ANOVA de dois fatores e teste de Sidak para comparações múltiplas. Em todas as análises o valor de p < 0,05 foi estatisticamente significativo.

4.2. EXPERIMENTAÇÃO *in vivo* COM CAMUNDONGOS C57BL/6 INF γ ^{-/-} E BALB/C

4.2.1. Determinação da parasitemia sistêmica e da carga parasitaria no tecido cardíaco por qPCR

Nos experimentos *in vivo* avaliamos a parasitemia sistêmica nos camundongos infectados com os parasitas TcP21^{-/-} e controle em ambos os modelos animais. Nos camundongos C57BL/6 INF γ ^{-/-} durante o período experimental de 15 dias não detectamos a presença de parasitas no sangue periférico (dados não mostrados). Ao analisar o sangue periférico dos camundongos BALB/c detectamos a presença de tripomastigotas sanguíneos a partir do 3º dpi até o 9º dpi, sendo que a quantidade de parasitas circulantes na corrente sanguínea (tripomastigotas sanguíneos) foi significativamente maior nos camundongos

infectados com parasitas TcP21^{-/-} no 3° e 6° dpi (<0,001) havendo depois uma diminuição no número de tripomastigotas TcP21^{-/-} circulantes, de acordo com a **Figura 15A**.

No 15° dpi, realizamos a eutanásia dos animais de ambas linhagens celulares, coletamos o coração para análise histopatológica e quantificação de DNA de *T. cruzi* no tecido cardíaco. Ao quantificar o DNA de *T. cruzi* no tecido cardíaco dos camundongos da linhagem C57BL/6 INF γ ^{-/-}, observamos que a quantidade de DNA dos parasitas TcP21^{-/-} foi significativamente menor (<0,0271) em relação a quantidade de DNA de parasitos parentais, conforme ilustrado na **Figura 15B**. E nos tecidos cardíacos dos camundongos da linhagem BALB/c, observamos quantidade de DNA de *T. cruzi* significativamente maior (<0,0011) nos camundongos infectados com TCT da cepa Y TcP21^{-/-} em relação ao controle (parentais), **Figura 15C**.

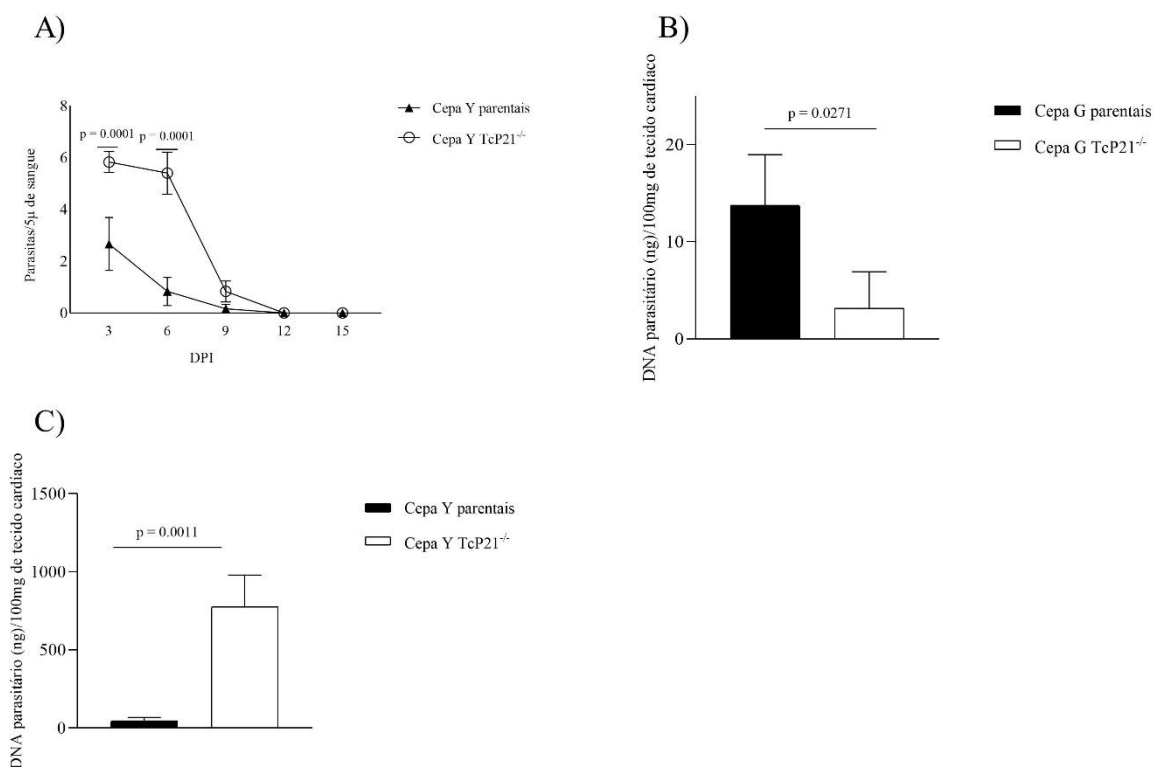


Figura 15. Parasitemia sistêmica de *T. cruzi* e carga parasitária do tecido cardíaca quantificada por qPCR. (A) Parasitemia sistêmica de cinco camundongos por grupo da linhagem BALB/c infectados com TCT da cepa Y TcP21^{-/-} e parentais. Os animais infectados com parasitas nocaute apresentaram maior parasitemia sistêmica; (B) Carga parasitária no tecido cardíaca de camundongos C57BL/6 INF γ ^{-/-} infectados com TCT da cepa G; (C) Carga parasitária no tecido cardíaco de camundongos BALB/c infectados com TCT da cepa Y. Todos os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.1, o gráfico mostra a média \pm erro padrão (EP) de três experimentos realizados em triplicata (A). A comparação da parasitemia sistêmica foi realizada utilizando two way ANOVA e teste de Bonferroni para comparações múltiplas. (B-C) A comparação dos dados de carga parasitária do tecido cardíaco entre os parasitas nocaute (TcP21^{-/-}) e controle (parentais) foi realizada com recurso ao teste t não pareado para comparações múltiplas. Em todas as análises o valor de p<0,05 foi estatisticamente significativo.

4.2.2. Alterações histopatológicas no tecido cardíaco

A **Figura 16**, ilustra alguns campos onde podemos observar claramente as diferenças descritas no tecido cardíaco de camundongos da linhagem C57BL/6 $INF\gamma^{-/-}$ (**Figura 16**) e no tecido cardíaco de camundongos BALB/c (**Figura 17**).

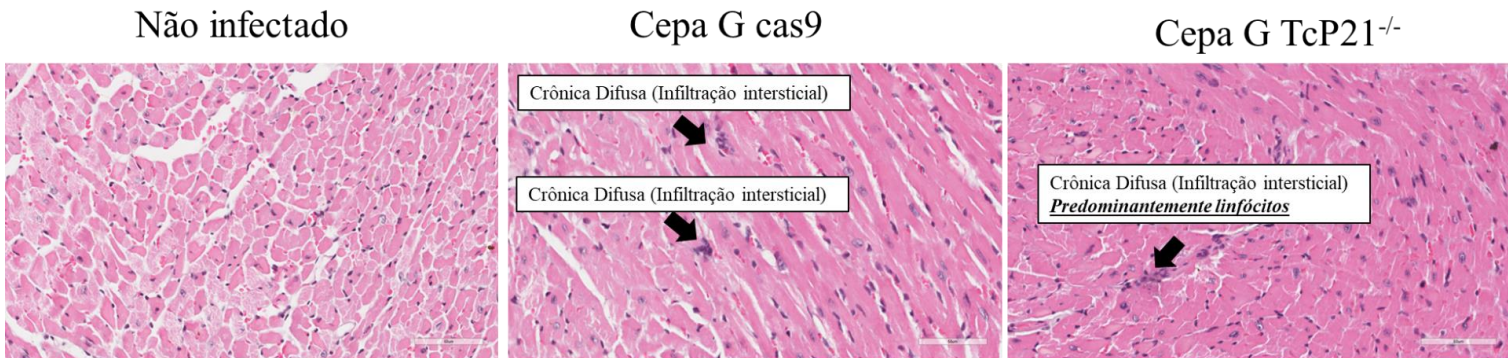


Figura 16. Imagens qualitativa de alterações histopatológicas do tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 nocaute para $INF\gamma$ infectados com *T. cruzi* da cepa G. As alterações histopatológicas estão indicadas por setas pretas, n = 5 animais por grupo. Os cortes histológicos foram corados em HE.

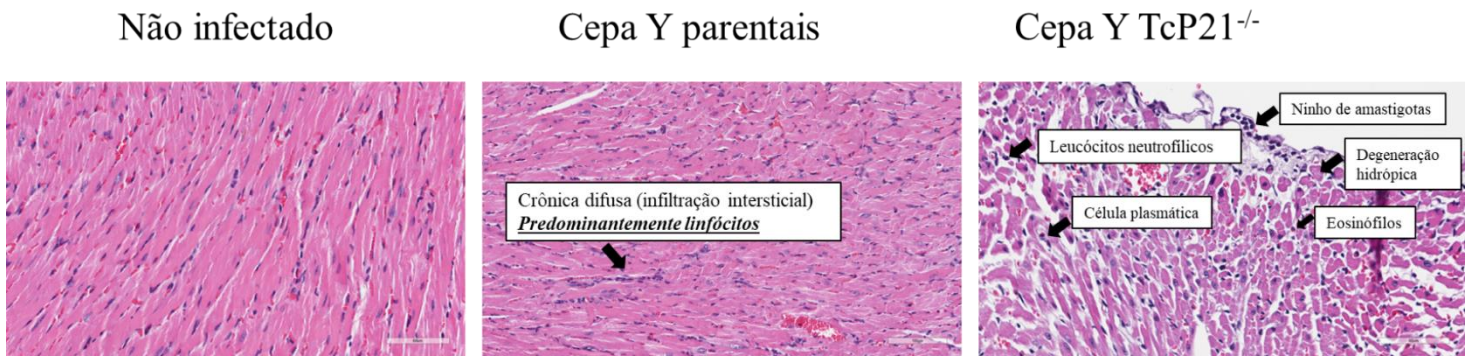


Figura 17. Imagens qualitativa de alterações histopatológicas do tecido cardíaco de camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi* da cepa Y. As alterações histopatológicas estão indicadas por setas pretas, os animais infectados com a cepa Y TcP21^{-/-} apresentaram qualitativamente maior infiltrado inflamatório e ninho de amastigotas em comparação aos demais grupos, n = 5 animais por grupo. Os cortes histológicos foram corados em HE.

Tabela 2. Análises qualitativas de tecidos cardíacos de camundongos nocaute para $INF\gamma$ (C57BL/6) aos 15 dias pós-infecção com TCT da cepa G de *T. cruzi*, corados em HE.

Crítérios Histológicos	<i>Não infectado (n=5)</i>	<i>Cepa G parentais (n=5)</i>	<i>Cepa G TcP21^{-/-} (n=5)</i>
Resposta inflamatória	Ausente	Baixa/Leve	Baixa/Leve
Predominância	-	Crônica difusa (Infiltração intersticial)	Crônica difusa (Infiltração intersticial)
Neutrófilos leucócitos	-	+	+
Eosinófilos	-	-	-
Macrófagos	-	+	+
Linfócitos	-	++	++
Células plasmáticas	-	+	+
Células gigantes de corpo estranhos	-	-	-
Dano tecidual	-	+	+
Degeneração hidrópica	-	++	++
Tecido necrótico	-	-	-
Corpos apoptóticos	-	-	-
Edema	-	+	+
Fibroblasto	-	+	+
Fibrose	-	+	+
Adipócito	-	-	-
Calcificação do epicárdio	-	-	-
Ninho de amastigotas	-	+	+

A análise histopatológica do tecido cardíaco de camundongos infectados com os parasitas TcP21^{-/-} e parentais da cepa G não mostrou diferença qualitativa entre si. Observamos apenas alterações leves a moderadas entre o tecido cardíaco proveniente de animais infectados em comparação com o controle, animais não infectados, conforme ilustrado na **Tabela 2**.

Tabela 3. Análises qualitativas de tecidos cardíacos de camundongos BALB/c aos 15 dias pós-infecção com TCT da cepa Y de *T. cruzi*, corados em HE.

Crítérios histológicos	<i>Não infectada (n=5)</i>	<i>Cepa Y parentais (n=5)</i>	<i>Cepa Y TcP21^{-/-} (n=5)</i>
Resposta inflamatória	Ausente	Baixa/leve	Moderada
Predominância	-	Crônica difusa (Infiltração intersticial)	Crônica difusa (Infiltração intersticial)
Neutrófilos	-	+	++
leucócitos	-	-	+
Eosinófilos	-	+	++
Macrófagos	-	++	+++
Linfócitos	-	+	+
Células plasmáticas	-	-	-
Células gigantes de corpo estranhos	-	+	++
Dano tecidual	-	++	+++
Degeneração hidrópica	-	-	-
Tecido necrótico	-	-	+
Corpos apoptóticos	-	+	+++
Edema	-	+	+
Fibroblasto	-	+	+
Fibrose	-	-	-
Adipócito	-	-	-
Calcificação do epicárdio	-	-	-
Ninho de amastigotas	-	+	++

A **Tabela 3** ilustra as alterações histopatológicas observados no tecido cardíaco de camundongos da linhagem BALB/c. Nos animais infectados com parasitas da cepa Y TcP21^{-/-} apresentaram qualitativamente maiores ocorrência de infiltrado de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, danos teciduais, corpos apoptóticos e ninhos amastigotas em comparação com tecidos de camundongos infectados com parasitas parentais da cepa Y.

4. DISCUSSÃO

A presente pesquisa foi realizada com o propósito de avaliar o efeito da proteína P21 na invasão celular, multiplicação intracelular, eclosão *Trypanosoma cruzi* *in vitro* e *in vivo* avaliamos de forma comparativa o parasitismo e alterações histopatológicas. Por isso, com recursos a técnica de CRISPR/cas9 foi realizado o silenciamento do gene da P21 e foram realizados experimentos em modelo *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, infectamos as linhagens celulares Vero e C2C12 com tripomastigotas de cultura de tecidos (TCT) das cepas G (DTU TcI) e Y (DTU TcII). Comparamos a invasão celular, multiplicação intracelular e a taxa de eclosão entre os parasitas que não expressam a proteína P21 (TcP21^{-/-}) com os parentais (expressam a proteína Cas9), os quais consideramos controle de cada cepa.

Realizamos também experimentos *in vivo*, onde comparamos o parasitismo, alterações histopatológicas em três grupos experimentais, infectados com TCT TcP21^{-/-}, TCT parentais e não infectados. Utilizamos as linhagem C57BL/6 nocaute ao INF γ e BALB/c, as quais foram infectadas com TCT das cepa G e Y de *T. cruzi*, respectivamente. A presente pesquisa é uma continuação dos nossos estudos relacionados ao papel da P21. Em nossos estudos anteriores realizados com a forma recombinante da P21 (rP21), demonstramos que a proteína mantém os parasitas intracelularmente com baixas taxas de multiplicação e indetectáveis pelo sistema imunológico do hospedeiro, levando a doença para a fase crônica sem parasitemia sistêmica detectável (Da Silva et al., 2009; Teixeira et al., 2019; Martins et al., 2020). Para confirmar esta hipótese, primeiro verificamos o impacto do silenciamento da P21 na invasão e multiplicação por tripomastigotas metacíclicos da cepa Y em células hospedeiras da linhagem celular HeLa. Os resultados corroboraram nossa hipótese, uma vez que o silenciamento da P21 prejudicou a invasão das células hospedeiras do parasita e induziu a multiplicação dos parasitas as 72 horas pós-infecção (Teixeira et al., 2022).

Na presente pesquisa, a invasão e multiplicação foram determinadas por coloração com Giemsa. Nos experimentos de invasão de acordo com o descrito na **Figura 7A e 7B**, os parasitas da cepa G TcP21^{-/-} invadiram significativamente menos as células hospedeiras (Vero e C2C12) e os parasitas da cepa Y TcP21^{-/-} invadiram significativamente menos a célula hospedeira C2C12 (**Figura 9B**). Esse resultados corroboram com os resultados do nosso estudo recente em tripomastigotas metacíclicos nocaute a P21 da cepa Y. Mas, em célula Vero observamos uma ligeira tendência de maior invasão celular pelos parasitas da cepa Y TcP21^{-/-} (**Figura 9A**). Supomos que tal achado possa estar relacionado à forma de parasita utilizada nos experimentos,

que foram os TCT ou com o efeito da proteína P21. Tal hipótese sustenta-se em nossos achados anteriores que corroboram com o observado na presente pesquisa. Em nossos estudos anteriores, realizado em célula HeLa e infectada com tripomastigotas metacíclicos (TM) observamos que os parasitas TcP21^{-/-} invadiram significativamente menos a célula hospedeira (Teixeira et al., 2022). Bem como os nossos achados com a forma recombinante da P21 (rP21), onde vimos que ela indutora da invasão (Da Silva et al., 2009). Acreditamos também que esses achados possam estar relacionados à linhagem celular bem como à cepa de *T. cruzi* utilizada. Pois, em nossos estudos realizados com célula HeLa observamos menor taxa de invasão celular (Teixeira et al., 2022) e na presente pesquisa na linhagem Vero infectada com a cepa Y a taxa de invasão de parasitas TcP21^{-/-} foi maior enquanto na C2C12 foi menor. Por isso, supomos que os nossos achados podem ser atribuídos a proteína P21, ou seja ela participa na invasão celular. Apesar de ainda não estar bem esclarecido o mecanismo de invasão celular mediado pela P21.

Considerando a taxa de multiplicação, observamos que a capacidade de multiplicação do parasita da cepa G TcP21^{-/-}, determinada por contagem em coloração com Giemsa, foi comprometida somente as 96 horas pós-infecção na linhagem celular Vero (**Figura 8C**). Estes parasitas multiplicaram-se de forma semelhante ao controlo durante os primeiros momentos de infecção nas células Vero e ao longo de toda a cinética na linhagem celular C2C12. Era previsível que estes parasitas TcP21^{-/-} teriam uma taxa de multiplicação mais baixa ao longo de toda a cinética de multiplicação devido à sua menor capacidade de invadir a célula hospedeira. No entanto, eles tiveram um número semelhante de amastigotas intracelulares durante a maioria dos momentos em ambas as linhagens celulares. Para reduzir erros de interpretação conduzimos os mesmo experimentos mais quantificamos o DNA de *T. cruzi* por qPCR, observamos que os parasitas TcP21^{-/-} apresentaram menor taxa de multiplicação durante a maioria dos momentos da infecção na linhagem celular Vero e na célula C2C12 somente no tempo de 72 horas (**Figura 11 A e B**). Na cepa Y, contagem pelo método de coloração demonstrou taxas de multiplicação quase que similar em todos os momentos, exceptuando no tempo de 48 em que observamos maior taxa de multiplicação de parasitas TcP21^{-/-} em célula Vero (**Figura 10D**) e as 72 horas observamos menor porcentagem de célula infectada por parasita TcP21^{-/-} em célula C2C12 (**Figura 10B**). No entanto, a qPCR em célula C2C12 demonstrou maior taxa de multiplicação as 72 horas pós-infecção para parasitas TcP21^{-/-} (**Figura 12**). Isto é consistente com a nossa hipótese levantada anteriormente e com o nosso estudo recente utilizando tripomastigotas metacíclicos da cepa Y (Teixeira et al., 2022).

Sendo os dados obtidos pela duas técnicas dados discrepantes, achamos que o que provavelmente possa ter afectado pode ser o método de coloração e contagem ao microscópio depende da acuidade visual e da experiência do examinador e, sem dúvida, apresenta viés. A qPCR é um método mais sensível e, neste caso, representaria o que está mais próximo da realidade, pois corrobora os dados obtidos sobre carga parasitária em tecido cardíaco de animais infectados, que serão discutidos a seguir. Nesse sentido, acreditamos que para a cepa G, que é uma cepa não virulenta, a P21 estaria envolvida na manutenção de um ciclo celular do parasita que garanta sua perpetuação no hospedeiro mamífero. Esta atividade é completamente diferente daquela que acreditamos ocorrer na cepa Y, por exemplo, que é uma cepa virulenta. Portanto, sugerimos que P21 possui caráter pleiotrópico, apresentando atividades diferentes de acordo com a cepa estudada. Assim, se a cepa for não virulenta, a P21 funcionaria para garantir um ciclo basocelular que garanta a perpetuação do parasita e se a cepa for virulenta, a P21 estaria envolvida no controle da multiplicação com o objetivo de reduzir o parasitismo e os danos ao hospedeiro também garantindo a perpetuação do parasita. Resumidamente, haveria duas atividades biológicas com a mesma finalidade, garantindo a sobrevivência do parasita e a sua perpetuação

A taxa de eclosão, observamos menor eclosão de TCT em célula Vero e C2C12 de parasitas TcP21^{-/-} da cepa G (**Figura 13 A e C**). Supomos que esses achados estejam relacionados com a menor taxa de invasão e multiplicação observada nas células infectadas pelos parasitas TcP21^{-/-}, conforme discutido anteriormente. Achamos que provavelmente a P21 possa ter afetado o tempo de permanência do parasita no vacúolo parasitóforo, fuga para o citosol, diferenciação do parasita de tripomastigota em amastigotas, multiplicação dos amastigotas e diferenciação de amastigotas em tripomastigotas e ruptura da célula para eclosão dos parasitas para o meio extracelular. Quanto as amastigotas observamos maior taxa de eclosão as 240 horas de parasitas TcP21^{-/-} da cepa G em célula Vero (**Figura 13B** e em célula C2C12 as 216 (**Figura 13D**). Supomos que esse achado pode estar relacionada a rotura precoce da célula ou a defeito na diferenciação do parasita de amastigota para tripomastigota.

Quanto a taxa de eclosão de tripomastigotas e amastigotas da cepa Y, foi similar em célula Vero (**Figura 14A e B**). Em célula C2C12 infectada com parasitas da cepa Y, observamos maior taxa de eclosão de tripomastigotas de parasitas Tc P21^{-/-}. Tais achados supomos que provavelmente estejam relacionados a taxa de multiplicação, embora na técnica de coloração no tempo de 96 horas observamos maior multiplicação sem diferença estatística,

na qPCR podemos observar ao longo da cinética de tempo uma ligeira tendência dos parasitas TcP21^{-/-} multiplicarem mais e de maneira significativa as 72 horas.

Nos experimentos *in vivo*, detectamos quantidade significativamente maior de tripomastigotas no sangue periférico a partir do 3º a 6º dia pós infecção (dpi), significativamente maior nos camundongos infectados com parasitas que não expressam a P21 nos camundongos da linhagem BALB/c infectados com TCT da cepa Y (**Figura 15A**). Esse resultado mostra que a P21 tem efeito sobre a parasitemia sistêmica que provavelmente os parasitas possam ter defeito na invasão celular, no caso dos achados do 3º dpi pois nos ensaios de eclosão no 3º dia não detectamos a presença de parasitas no sobrenadante. Quanto aos achados observados no 6º dpi supomos que possam estar relacionados a maior taxa multiplicação (observada na qPCR em C2C12) e taxa de eclosão. Tal suposição é sustentada pelo facto de termos observado maior taxa de eclosão de parasitas TcP21^{-/-} na linhagem celular C2C12 infectada com a parasitas da cepa Y as 144 horas (6º dpi).

No entanto, nos camundongos da linhagem C57BL/6 nocaute ao interferon gamma (C57BL/6 INF γ ^{-/-}), não detectamos parasitas circulantes no sangue periférico durante todo o período experimental de 15 dias. Supomos que tal achado pode ser devido a forma de parasita que utilizamos, tripomastigota. Uma vez que em nosso estudo anterior, que realizamos em diferentes linhagens de camundongos nocautes para diversas citocinas. Detectamos parasitemia nos camundongos da linhagem C57BL/6 nocaute para o interferon gamma e infectados com formas amastigotas extracelulares. Um estudo que corrobora com os nossos achados é o realizado por Ferreira et al. (2016). Onde realizaram infecção intraperitoneal de TCT da cepa G em camundongos BALB/c e C57BL/6 INF γ ^{-/-}. Não detectaram parasitemia sistêmica aparente ao 8 dia pós infecção. Outro aspecto a ter em conta, é o tropismo celular. Ele também difere entre essas formas, uma vez que os tripomastigotas delgados infectam preferencialmente células do sistema monofagocitário nuclear no baço, fígado e medula óssea, enquanto as formas arredondadas apresentam tropismo por células musculares lisas, cardíacas e estriadas (Lana & Tafuri, 2000).

Apesar de não termos observado parasitemia sistêmica patente nos camundongos C57BL/6 INF γ ^{-/-}, a qPCR demonstrou a existência de DNA de *T. cruzi* da cepa G. Detectamos menor quantidade de DNA de *T. cruzi* dos parasitas TcP21^{-/-} (**Figura 15B**). Este resultado está em concordância com os achados observados nos experimentos *in vitro* principalmente a multiplicação intracelular onde observamos menor quantidade de amastigotas de parasitas TcP21^{-/-} no tempo de 96 horas pós-infecção. Na qPCR do tecido cardíaco na cepa Y,

observamos maior quantidade de DNA de *T. cruzi* de parasitas TcP21^{-/-} (**Figura 15C**). Podemos supor que este resultado está de acordo com a multiplicação se olharmos para os nossos resultados da qPCR em célula C2C12.

Os achados que observamos ao analisar lesão tecidual por HE (**Tabela 2 e Figura 16A**), corroboram com os achados da qPCR. No tecido cardíaco dos camundongos C57BL/6 INF γ ^{-/-} não observamos qualitativamente diferenças entre o tecido cardíaco de camundongos infectados com parasita TcP21^{-/-} com os que expressam a P21. Por outro lado, o tecido dos camundongos BALB/c infectados com TCT da cepa Y, observamos qualitativamente maiores ocorrência de infiltrado de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, danos teciduais, corpos apoptóticos e ninhos amastigotas no tecido dos camundongos infectados com parasitas TcP21^{-/-}. Esses achados estão em concordância com os nossos achados na qPCR.

Estes resultados sugerem uma atividade pleiotrópica da proteína P21 que em cepa pouco virulenta (cepa G) atua de forma a garantir a perpetuação da infecção por meio da manutenção da multiplicação do parasita e sustentam ainda mais a nossa hipótese de que a P21 é uma molécula importante no controle da infecção por cepas virulentas (cepa Y), a fim de estabelecer uma infecção crônica sem parasitismo sistêmico e sem maiores danos ao hospedeiro vertebrado.

5. CONCLUSÕES

Com a presente pesquisa podemos concluir que a P21 tem efeito pleiotrópico na invasão, multiplicação e eclosão de acordo com as linhagens celulares envolvidas e a cepa do parasita. Na invasão podemos concluir que na cepa G, considerada pouco virulenta, a P21 induz a invasão celular na linhagem celular Vero e C2C12, pois os parasitas TcP21^{-/-} invadiram significativamente menos a célula hospedeira. Enquanto que na cepa Y, considerada virulenta, o efeito foi variado de acordo com a linhagem celular, em célula Vero vimos que a P21 inibe a invasão e na C2C12 induz a invasão, pois os parasitas TcP21^{-/-} invadiram significativamente menos a célula hospedeira.

Na multiplicação celular por coloração com Giemsa, a P21 demonstrou efeito sobre a multiplicação intracelular de *T. cruzi* em ambas linhagens celulares (Vero e C2C12), na infecção com a cepa G vimos que aumenta a multiplicação. Na infecção com a cepa Y, a P21 demonstrou influenciar a multiplicação de maneira diferenciada nas linhagens celular Vero e C2C12. A qPCR, na cepa G, demonstrou menor quantidade de DNA de *T. cruzi* dos parasitas TcP21^{-/-} na linhagem celular Vero e C2C12 enquanto na cepa Y na linhagem celular C2C12 vemos que a ausência da P21 induz a multiplicação. Apesar das discrepâncias entre as duas técnicas, podemos afirmar que na linhagem celular Vero e C2C12 infectada pela cepa G demonstramos que a P21 induz a multiplicação celular e nas mesmas linhagens infectadas com a cepa Y demonstramos que ela inibe a multiplicação do parasita.

Na ausência da P21 vimos menor taxa de eclosão de TCT da cepa G e supomos que possivelmente esteja relacionada a menor taxa de invasão e multiplicação intracelular observada nesta cepa em ambas linhagens celulares. Por outro lado, na cepa Y, a ausência da P21 beneficiou a eclosão de TCT na linhagem celular C2C12. Esses resultados demonstram que a P21 tem efeito na eclosão e que esse efeito pode variar de acordo com a linhagem celular e cepa do parasita.

Quanto a parasitemia sistêmica, nos camundongos C57BL/6 INF γ ^{-/-} infectados com parasitas da cepa G não detectamos parasitemia sistêmica, vimos que este achado é independente da P21 sendo característico da cepa G e da forma do parasita. Nos camundongos da linhagem BALB/c, vimos que a ausência da P21 interfere de forma a aumentar a parasitemia sistêmica e o parasitismo tecidual. Assim, podemos dizer que a P21 contribui para a retenção intracelular do parasita. Alterações histopatológicas confirmaram nossa hipótese, pois no tecido cardíaco de animais infetados com a cepa Y na ausência da P21 vimos maior infiltrado de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, danos teciduais, corpos apoptóticos e ninhos amastigotas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAS, A., GÁLLEGO, M., MUÑOZ, C., JUIZ, N. A., RAMÍREZ, J. C., CURA, C. I., TEBAR, S., FERNÁNDEZ-ARÉVALO, A., PINAZO, M. J., DE LA TORRE, L., POSADA, E., NAVARRO, F., ESPINAL, P., BALLART, C., PORTÚS, M., GASCÓN, J., & SCHIJMAN, A. G. **Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain)**. *Parasitology International*, 66(2), 83–88, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.12.003>
- ABRAS, A., GÁLLEGO, M., MUÑOZ, C., JUIZ, N. A., RAMÍREZ, J. C., CURA, C. I., TEBAR, S., FERNÁNDEZ-ARÉVALO, A., PINAZO, M. J., DE LA TORRE, L., POSADA, E., NAVARRO, F., ESPINAL, P., BALLART, C., PORTÚS, M., GASCÓN, J., & SCHIJMAN, A. G. **Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain)**. *Parasitology International*, 66(2), 83–88, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.12.003>
- ACQUATELLA, H., ASCH, F. M., BARBOSA, M. M., BARROS, M., BERN, C., CAVALCANTE, J. L., ECHEVERRIA CORREA, L. E., LIMA, J., MARCUS, R., MARIN-NETO, J. A., MIGLIORE, R., MILEI, J., MORILLO, C. A., NUNES, M. C. P., CAMPOS VIEIRA, M. L., & VIOTTI, R. **Recommendations for Multimodality Cardiac Imaging in Patients with Chagas Disease: A Report from the American Society of Echocardiography in Collaboration With the InterAmerican Association of Echocardiography (ECOSIAC) and the Cardiovascular Imaging Department of the Brazilian Society of Cardiology (DIC-SBC)**. *Journal of the American Society of Echocardiography*, 31(1), 3–25, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2017.10.019>
- ACQUATELLA, H., ASCH, F. M., BARBOSA, M. M., BARROS, M., BERN, C., CAVALCANTE, J. L., ECHEVERRIA CORREA, L. E., LIMA, J., MARCUS, R., MARIN-NETO, J. A., MIGLIORE, R., MILEI, J., MORILLO, C. A., NUNES, M. C. P., CAMPOS VIEIRA, M. L., & VIOTTI, R. **Recommendations for Multimodality Cardiac Imaging in Patients with Chagas Disease: A Report from the American Society of Echocardiography in Collaboration With the InterAmerican Association of Echocardiography (ECOSIAC) and the Cardiovascular Imaging Department of the Brazilian Society of Cardiology (DIC-SBC)**. *Journal of the American Society of Echocardiography*, 31(1), 3–25, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2017.10.019>
- ALBA SOTO, C. D., AND GONZÁLEZ CAPP, S. M. **“*Trypanosoma cruzi* Journey from the Insect Vector to the Host Cell,”** in Chagas Disease: A Clinical Approach. Eds. J. M. Altchek and H. Freilij (Cham, Switzerland: Springer International Publishing), 25–59, 2019 doi: 10.1007/978-3-030-00054-7_2
- ALBAREDA, M.C., LAUCELLA, S.A., ALVAREZ, M. G. ARMENTI, A.H., BERTOCHI, G., TARLETON, R.L. POSTAN, M. ***Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8⁺ T cells in chronic Chagas' disease patients**, *International Immunology*, Volume 18, Issue 3, March, Pages 465–471, 2006 <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh387>
- ALBAREDA, M.C., LAUCELLA, S.A., ALVAREZ, M. G. ARMENTI, A.H., BERTOCHI, G., TARLETON, R.L. POSTAN, M. ***Trypanosoma cruzi* modulates the**

profile of memory CD8⁺ T cells in chronic Chagas' disease patients, *International Immunology*, Volume 18, Issue 3, March, Pages 465–471, 2006
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxh387>

ALBERTTI, L. A. G., MACEDO, A. M., CHIARI, E., ANDREWS, N. W., AND ANDRADE, L. O. **Role of Host Lysosomal Associated Membrane Protein (LAMP) in Trypanosoma Cruzi Invasion and Intracellular Development.** *Microbes Infect.* 12 (10), 784–789, 2010. doi: 10.1016/j.micinf.2010.05.015

ALIOUAT-DENIS, C.-M., MARTINEZ, A., ALIOUAT, E. M., POTTIER, M., GANTOIS, N., & DEI-CAS, E. **The Pneumocystis life cycle.** Em *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* (Vol. 104, Número 3), 2009.

ALIOUAT-DENIS, C.-M., MARTINEZ, A., ALIOUAT, E. M., POTTIER, M., GANTOIS, N., & DEI-CAS, E. **The Pneumocystis life cycle.** Em *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* (Vol. 104, Número 3), 2009.

ALMEIDA, I.C., GAZZINELLI, R.T. **Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from Trypanosoma cruzi: structural and functional analyses,** *J. Leukoc. Biol* 70 467–477, 2001 <https://doi.org/>

ALMEIDA, I.C., GAZZINELLI, R.T. **Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from Trypanosoma cruzi: structural and functional analyses,** *J. Leukoc. Biol* 70 467–477, 2001 <https://doi.org/>

ALVES, M.J.M.; COLLI, W. **Role of the gp85/Trans-Sialidase Superfamily of Glycoproteins in the Interaction of Trypanosoma cruzi with Host Structures.** In *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion*; Springer: New York, NY, USA, ; pp. 58–69, 2008.

ALVES, M.J.M.; COLLI, W. **Role of the gp85/Trans-Sialidase Superfamily of Glycoproteins in the Interaction of Trypanosoma cruzi with Host Structures.** In *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion*; Springer: New York, NY, USA, ; pp. 58–69, 2008.

ANDRADE SG, CAMPOS RF, STEINDEL M, GUERREIRO ML, MAGALHÃES JB, ALMEIDA MC, et al. **Biological, biochemical and molecular features of Trypanosoma cruzi strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new T. cruzi Taxonomy Consensus (2009).** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* ;106(8): 948-56, 2011

ANDRADE SG, CAMPOS RF, STEINDEL M, GUERREIRO ML, MAGALHÃES JB, ALMEIDA MC, et al. **Biological, biochemical and molecular features of Trypanosoma cruzi strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new T. cruzi Taxonomy Consensus (2009).** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* ;106(8): 948-56, 2011

ANDRADE, S. G., ANDRADE, Z. A., & FIGUEIRA, R. M. ([s.d.]). *Estudo experimental sobre a resistência de uma cepa do trypanosoma cruzi ao bay 2502.*

ANDRADE, S. G., ANDRADE, Z. A., & FIGUEIRA, R. M. ([s.d.]). *Estudo experimental sobre a resistência de uma cepa do trypanosoma cruzi ao bay 2502.*

ANDRADE, S. G.; CARVALHO, M. L. & FIGUEIRA, R. M. - **Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do Trypanosoma cruzi.** *Gaz. Med. Bahia* 70: 32-42, 1970. ANDRADE SG. **Caracterização de cepas do Trypanosoma cruzi**

isoladas no recôncavo baiano (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). Rev. Pat. Trop 3: 65-121, 1974

ANDRADE, S. G.; CARVALHO, M. L. & FIGUEIRA, R. M. - **Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi***. Gaz. Med. Bahia 70: 32-42, 1970. ANDRADE SG. **Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no recôncavo baiano (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio)**. Rev. Pat. Trop 3: 65-121, 1974

ANDREWS, N. W., HONG, K. S., ROBBINS, E. S., AND NUSSENZWEIG, V. **Stage-Specific Surface Antigens Expressed during the Morphogenesis of Vertebrate Forms of *Trypanosoma Cruzi***. Exp. Parasitol. 64, 474–484, 1987. doi: 10.1016/0014-4894(87)90062-2

ANTINORI S, GALIMBERTI L, BIANCO R, GRANDE R, GALLI M, CORBELLINO M. **Chagas disease in Europe: a review for the internist in the globalized world**. Eur J Int Med. 43:6–15, 2017. doi: 10.1016/j.ejim.2017.05.001

ANTINORI S, GALIMBERTI L, BIANCO R, GRANDE R, GALLI M, CORBELLINO M. **Chagas disease in Europe: a review for the internist in the globalized world**. Eur J Int Med. 43:6–15, 2017. doi: 10.1016/j.ejim.2017.05.001

ANTINORI, S., GALIMBERTI, L., BIANCO, R., GRANDE, R., GALLI, M., & CORBELLINO, M. **Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world**. Em *European Journal of Internal Medicine* (Vol. 43, p. 6–15). Elsevier B.V. 2017 <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2017.05.001>

ANTINORI, S., GALIMBERTI, L., BIANCO, R., GRANDE, R., GALLI, M., & CORBELLINO, M. **Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world**. Em *European Journal of Internal Medicine* (Vol. 43, p. 6–15). Elsevier B.V. 2017 <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2017.05.001>

AUFDERHEIDE, A. C., SALO, W., MADDEN, M., STREITZ, J., BUIKSTRA, J., GUHL, F., ARRIAZA, B., RENIER, C., WITTMERS, L. E. I., FORNACIARI, G., & ALLISON, M. **A 9,000-year record of Chagas' disease**. 2003 www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0307312101

AVISE, J.C., . **Molecular markers, Natural History and Evolution**, second ed. Chapman & Hall, New York, London, 2004.

Hall, B.S., Bot, C., Wilkinson, S.R. **Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites**, J. Biol. Chem. 286 (15) 13088–13095, 2011.

Hall, B.S. & Wilkinson, S.R. **Activation of benzimidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation**, Antimicrob. Agents Chemother. 56 (1) 115–123, 2012.

BAIDA RC, SANTOS MR, CARMO MS, YOSHIDA N, FERREIRA D, FERREIRA AT, EL SAYED NM, ANDERSSON B, DA SILVEIRA JF. **Molecular characterization of serine-, alanine-, and proline-rich proteins of *Trypanosoma cruzi* and their possible role in host cell infection**. Infect Immun. 2006 Mar;74(3):1537-46. doi: 10.1128/IAI.74.3.1537-1546.2006. PMID: 16495524; PMCID: PMC1418663.

BALOUZ, V., BRACCO, L., ROMER, G., RICCI, A. D., AGÜERO, F., AND BUSCAGLIA, C. **Serological Approaches for Trypanosoma Cruzi Strain Typing.** Trends Parasitol. 37, 214–225, 2021. doi: 10.1016/j.pt.2020.12.002

BARBOSA, M. DAS G. V., FERREIRA, J. M. B. B., ARCANJO, A. R. L., SANTANA, R. A. G., MAGALHÃES, L. K. C., MAGALHÃES, L. K. C., MOTA, D. T., FERREIRA FÉ, N., MONTEIRO, W. M., SILVEIRA, H., & DE GUERRA, J. A. O.. **Chagas disease in the state of Amazonas: History, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 48, 27–33, 2015. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0258-2013>

BARBOSA, M. DAS G. V., FERREIRA, J. M. B. B., ARCANJO, A. R. L., SANTANA, R. A. G., MAGALHÃES, L. K. C., MAGALHÃES, L. K. C., MOTA, D. T., FERREIRA FÉ, N., MONTEIRO, W. M., SILVEIRA, H., & DE GUERRA, J. A. O.. **Chagas disease in the state of Amazonas: History, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 48, 27–33, 2015. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0258-2013>

BARNABÉ, C., MOBAREC, H. I., JURADO, M. R., CORTEZ, J. A., & BRENIÈRE, S. F. (2016). **Reconsideration of the seven discrete typing units within the species Trypanosoma cruzi, a new proposal of three reliable mitochondrial clades.** Infection, Genetics and Evolution, 39, 176–186. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.029>

BARNABÉ, C., MOBAREC, H. I., JURADO, M. R., CORTEZ, J. A., & BRENIÈRE, S. F. **Reconsideration of the seven discrete typing units within the species Trypanosoma cruzi, a new proposal of three reliable mitochondrial clades.** Infection, Genetics and Evolution, 39, 176–186, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.029>

BARRETT, M. P., BURCHMORE, R. J. S., STICH, A., LAZZARI, J. O., FRASCH, A. C., CAZZULO, J. J., & KRISHNA, S. **The trypanosomiases.** The Lancet, 362(9394), 1469–1480, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14694-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14694-6)

BARRIAS, E. S., DE CARVALHO, T. M. U., AND SOUZA, W. DE. **Trypanosoma cruzi: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation.** Front. Immunol 4, 186. 2013. doi: 10.3389/fimmu.2013.00186

BARRIAS, E. S., REIGNAULT, L. C., DE SOUZA, W., AND CARVALHO, T. M. U. **Trypanosoma Cruzi Uses Macropinocytosis as an Additional Entry Pathway into Mammalian Host Cell.** Microbes Infect. 14 (14), 1340–1351, 2012. doi: 10.1016/j.micinf.2012.08.003

BARRIAS, E., REIGNAULT, L., DE CARVALHO, T. M. U., AND DE SOUZA, W. **Clathrin Coated Pit Dependent Pathway for Trypanosoma Cruzi Internalization into Host Cells.** Acta Tropica 199 (June), 105057, 2019 doi: 10.1016/j.actatropica.

Basile L, Oliveira I, Ciruela P, Plasencia A, **Working Group For Developing The Catalonian Screening Programme for Congenital Transmission of Chagas Disease. The current screening programme for congenital transmission of Chagas disease in Catalonia, Spain.** Euro Surveill, 22:19972, 2011. doi: 10.2807/ese.16.38.19972-en

BATISTA, M. F., NÁJERA, C. A., MENEGHELLI, I., AND BAHIA, D. **The Parasitic Intracellular Lifestyle of Trypanosomatids: Parasitophorous Vacuole Development and Survival.** Front. Cell Dev. Biol 8, 396, 2020. doi: 10.3389/fcell.2020.00396

BAYER-SANTOS, E., AGUILAR-BONAVIDES, C., RODRIGUES, S. P., MAURÍCIO CORDERO, E., FERREIRA MARQUES, A., VARELA-RAMIREZ, A., et . **Proteomic**

Analysis of Trypanosoma Cruzi Secretome: Characterization of Two Populations of Extracellular Vesicles and Soluble Proteins. *J. Proteome Res.* 12 (2), 883–897, 2013a. doi: 10.1021/pr300947g

BELAUNZARÁN, M. L., WILKOWSKY, S. E., LAMMEL, E. M., GIMÉNEZ, G., BOTT, E., BARBIERI, M. A., et al. **Phospholipase A1: A Novel Virulence Factor in Trypanosoma Cruzi.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 187, 77–86, 2013. doi: 10.1016/j.molbiopara.2012.12.004

BELAUNZARÁN, M. L., WAINSELBAUM, M. J., LAMMEL, E. M., GIMENEZ, G., ALOISE, M. M., FLORIN-CHRISTENSEN, J., et al. **Phospholipase A1 from Trypanosoma Cruzi Infective Stages Generates Lipid Messengers That Activate Host Cell Protein Kinase C.** *Parasitology* 134 (4), 491–502, 2007. doi: 10.1017/S0031182006001740

BELTRAN-HORTELANO, I., PEREZ-SILANES, S., & GALIANO, S. **Trypanothione Reductase and Superoxide Dismutase as Current Drug Targets for Trypanosoma cruzi: An Overview of Compounds with Activity against Chagas Disease.** *Current Medicinal Chemistry*, 24(11), 2017. <https://doi.org/10.2174/0929867323666161227094049>

BENABDELLAH, K., GONZÁLEZ-REY, E., AND GONZÁLEZ, A. Alternative Trans-Splicing of the Trypanosoma Cruzi LYT1 Gene Transcript Results in Compartmental and Functional Switch for the Encoded Protein. *Mol. Microbiol.* 65 (6), 1559–1567, 2007. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05892.x

BENCHIMOL, JL., and SÁ, MR., eds. and orgs. Adolpho Lutz e a entomologia médica no Brasil =Adolpho Lutz medical entomology in Brazil [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2006. 508 p. Adolpho Lutz Obra Completa, v.2, book 3. ISBN: 85-7541-043-1. Available from SciELO Books<<http://books.scielo.org>>.

BENCHIMOL, JL., and SÁ, MR., eds. and orgs. Adolpho Lutz: Entomologia - tabanídeos = Entomology - tabanidae [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2005. 704 p. Adolpho Lutz Obra Completa, v.2, book 2. ISBN: 85-7541-065-2. Available from SciELO Books .

BERN, C. **Chagas' Disease.** *New England Journal of Medicine*, 373(5), 456–466, 2015. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150>

BOCCHI, A., BESTETTI, R. B., SCANAVACCA, M. I., NETO, E. C., & ISSA, V. S. (2017). **Chronic Chagas Heart Disease Management From Etiology to Cardiomyopathy Treatment.**

BOCCHI EA, BESTETTI RB, SCANAVACCA MI, CUNHA NETO E, ISSA VS. **Chronic Chagas Heart Disease Management: From Etiology to Cardiomyopathy Treatment.** *J Am Coll Cardiol.* Sep 19;70(12):1510-1524, 2017. doi: 10.1016/j.jacc.2017.08.004. PMID: 28911515.

BOCK M, GONERT R, HABERKORN A. Studies with Bay 2502 on animals. *Bol Chil Parasitol* 24: 13-19, 1969

BONFIM-MELO, A., FERREIRA, É. R., AND MORTARA, R. A. **Rac1/WAVE2 and Cdc42/N-WASP Participation in Actin-Dependent Host Cell Invasion by Extracellular Amastigotes of Trypanosoma Cruzi.** *Front. Microbiol.* 9, 2018.00360 (FEB), 2018b doi: 10.3389/fmicb.2018.0036

- BONFIM-MELO, A., FERREIRA, E. R., FLORENTINO, P. T. V., AND MORTARA, R. A. **Amastigote Synapse: The Tricks of Trypanosoma Cruzi Extracellular Amastigotes.** *Front. Microbiol.* 9, 2018.01341 (JUN), 2018b. doi: 10.3389/fmicb.2018.0134
- BOLOGNESI, M.L. **Polypharmacology in a single drug: multitarget drugs,** *Curr. Med.Chem.* 20 (13) 1639–1645, 2013 <https://doi.org/10.2174/0929867311320130004>.
- BRENER Z. **Atividade terapêutica do 5-nitrofuraldeido-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental pelo Trypanosoma cruzi.** *Rev Inst Med Trop São Paulo* 3: 43-49, 1961.
- BRENER Z, ANDRADE Z. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; pp. 463,1979
- BRENER Z, ANDRADE Z. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; pp. 463,1979
- BRENER Z. **Atividade terapêutica do 5-nitrofuraldeido-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental pelo Trypanosoma cruzi.** *Rev Inst Med Trop São Paulo* 3: 43-49, 1961.
- BRENER Z. **Terapêutica experimental da doença de Chagas.** In **JR Cançado, Doença de Chagas.** Belo Horizonte, Imprensa Oficial de Minas Gerais, Minas Gerais, p. 510-516, 1968.
- BRENER Z. **Terapêutica experimental da doença de Chagas.** In **JR Cançado, Doença de Chagas.** Belo Horizonte, Imprensa Oficial de Minas Gerais, Minas Gerais, p. 510-516, 1968.
- BRUMPT E. **Precis de parasitologie.** *J Parasitol.*14:277, 1928. doi: 10.2307/3271390
- BUBIS, J., MARTÍNEZ, J. C., CALABOKIS, M., FERREIRA, J., SANZ-RODRÍGUEZ, C. E., NAVAS, V., et al. **The Gene Product of a Trypanosoma Equiperdum Ortholog of the CAMP-Dependent Protein Kinase Regulatory Subunit Is a Monomeric Protein That Is Not Capable of Binding Cyclic Nucleotides.** *Biochimie* 146, 166–180, 2018. doi: 10.1016/j.biochi.2017.12.010
- BUDNICK, L. D., BOCCO, B. W., & MONTGOMERY, S. P. **Work-Related Trypanosoma cruzi Exposures.** Em *Journal of Occupational and Environmental Medicine* (Vol. 61, Número 10, p. E429–E431. Lippincott Williams and Wilkins, 2019. <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000001674>
- BURGOS, J. M., RISSO, M. G., BRENIÈRE, S. F., BARNABÉ, C., CAMPETELLA, O., AND LEGUIZAMÓN, M. S. **Differential Distribution of Genes Encoding the Virulence Factor Trans-Sialidase along Trypanosoma Cruzi Discrete Typing Units.** *PLoS One* 8 (3), 9–11, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0058967
- BURLEIGH, B. A. **Host Cell Signaling and Trypanosoma Cruzi Invasion: Do All Roads Lead to Lysosomes?** *Sci. STKE* 2005, pe36. doi: 10.1126/stke.2932005pe36
- BUSCAGLIA, C. A., CAMPO, V. A., NOIA, J. M. DI, TORRECILHAS, A. C. T., DEMARCHI, C. R., FERGUSON, M. A. J., et al. **The Surface Coat of the Mammal-Dwelling Infective Trypomastigote Stage of Trypanosoma Cruzi Is Formed by Highly Diverse Immunogenic Mucins.** *J. Biol. Chem.* 279, 15860–15869, 2004. doi: 10.1074/Jbc.M314051200
- BUTLER, C. E., DE CARVALHO, T. M. U., GRISARD, E. C., FIELD, R. A., AND TYLER, K. M. **Trans-Sialidase Stimulates Eat Me Response from Epithelial Cells.** *Traffic* 14 (7), 853–869, 2013. doi: 10.1111/tra.12078

CAI, C.W., BLASE, J.R., ZHANG, X., EICKHOFF, C.S., Hoft, D.F. **Th17 cells are more protective than Th1 cells against the intracellular parasite *Trypanosoma cruzi***, PLoS Pathog. 12, 1–23, 2016 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005902>.

CÁMARA, M. DE L. M., CÁNEPA, G. E., LANTOS, A. B., BALOUZ, V., YU, H., CHEN, X., ET AL. **The Trypomastigote Small Surface Antigen (TSSA) Regulates *Trypanosoma Cruzi* Infectivity and Differentiation**. PLoS Neglect. Trop. Dis, 2017.

CAMPETELLA, O., BUSCAGLIA, C. A., MUCCI, J., AND LEGUIZAMÓN, M. S. **Parasite- Host Glycan Interactions during *Trypanosoma Cruzi* Infection: Trans-Sialidase Rides the Show**. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. 1866 (5), 165692, 2020. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165692

CAMPO, V. A., BUSCAGLIA, C. A., DI NOIA, J. M., AND FRASCH, A. C. C. **Immunocharacterization of the Mucin-Type Proteins from the Intracellular Stage of *Trypanosoma Cruzi***. Microbes Infect. 8, 401–409, 2006. doi: 10.1016/j.micinf.2005.07.008

CAMPOS, M.A.S., ALMEIDA, I.C., TAKEUCHI, O., AKIRA, S., VALENTE, E.P., PROCÓPIO, D.O., TRAVASSOS, L.R SMITH, J.A., GOLENBOCK, D.T., GAZZINELLI, R.T. **Activation of toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite**, J. Immunol. 167:416–423, 2001 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.416>.

CANÇADO JR . **Standartization of protocols for chemotherapy of Chagas disease (Working paper for discussion) Workshop on Standartizacion of Protocols for the Chemotherapy of Chagas Disease UNDP/World Bank/TDR**. PAHO, Washington, November, 22-26, 1981.

CANÇADO JR, DUVAL MARRA U, MOURÃO OG, ÁLVARES JM, OLIVEIRA J, SALGADO A. **Bases para avaliação do tratamento específico da doença de Chagas humana segundo a parasitemia**. Rev Soc Bras Med Trop 7: 155-166, 1973.

CANÇADO JR, MARRA UD, BRENER Z. **Ensaio terapêutico clínico com a 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona (Nitrofurazona) na forma crônica da doença de Chagas**. Rev Inst Med Trop São Paulo 6: 12-16. 1964.

CANÇADO JR. **Standartization of protocols for chemotherapy of Chagas disease (Working paper for discussion) Workshop on Standartizacion of Protocols for the Chemotherapy of Chagas Disease UNDP/World Bank/TDR**. PAHO, Washington, November, 22-26, 1981.

CANÇADO JR. **Tratamento da doença de Chagas**. In JR Cançado, Doença de Chagas, Imprensa Oficial de Minas Gerais, Minas Gerais, p. 517-540, 1968.

CÁNEPA, G. E., DEGESE, M. S., BUDU, A., GARCIA, C. R. S., BUSCAGLIA, C. A., CANEPA, G. E., et al.. **Involvement of TSSA (Trypomastigote Small Surface Antigen) in *Trypanosoma Cruzi* Invasion of Mammalian Cells**. Biochem. J. 444 (2), 211–218, 2012. doi: 10.1042/BJ20120074

CANTEY, P. T., STRAMER, S. L., TOWNSEND, R. L., KAMEL, H., OFAFA, K., TODD, C. W., CURRIER, M., HAND, S., VARNADO, W., DOTSON, E., HALL, C., JETT, P. L., & MONTGOMERY, S. P. **CDC - Chagas Disease**. *Transfusion*, 52(9), 1922–1930, 2012. <https://doi.org/10.1111/J.1537-2995.2012.03581.X/FULL>

- CARADONNA, K.L.; BURLEIGH, B.A. **Mechanisms of Host Cell Invasion by Trypanosoma cruzi.** In *Advances in Parasitology*; Academic. Press: Cambridge, MA, USA, pp. 33–61, 2011.
- CARDOSO, M. S., REIS-CUNHA, J. L., AND BARTHOLOMEU, D. C. **Evasion of the Immune Response by Trypanosoma Cruzi during Acute Infection.** *Front. Immunol.* 6, 2015.00659 (JAN), 2016. doi: 10.3389/fimmu.2015.00659
- CARLOS, J., DIAS, P., NETO, V. A., DE, J., & LUNA, A. **Mecanismos alternativos de transmissão do Trypanosoma cruzi no Brasil e sugestões para sua prevenção Alternative transmission mechanisms of Trypanosoma cruzi in Brazil and proposals for their prevention.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(3), 375–379, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011005000032>
- CARREA, A., & DIAMBRA, L. **Systems biology approach to model the life cycle of Trypanosoma cruzi.** *PLoS ONE*, 11(1), 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146947>
- CASTRO-GOMES, T., CORROTTE, M., TAM, C., AND ANDREWS, N. W. **Plasma Membrane Repair Is Regulated Extracellularly by Proteases Released from Lysosomes.** *PLoS One* 11, e0152583, 2016 doi: 10.1371/journal.pone.0152583
- CAVAZZANA, M., MARCILI, A., LIMA, L., DA SILVA, F. M., JUNQUEIRA, Â. C. V., VELUDO, H. H., VIOLA, L. B., CAMPANER, M., NUNES, V. L. B., PAIVA, F., COURA, J. R., CAMARGO, E. P., & TEIXEIRA, M. M. G. **Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus Schizotrypanum parasitic in Brazilian bats.** *International Journal for Parasitology*, 40(3), 345–355, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.08.015>
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **Chagas disease after organ transplantation-Los Angeles, California,** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*; 5: 798-800, 2006
- CDCP (Centers for Disease Control and Prevention). **Chagas Disease.** Available at: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/>. Accessed August 26, 2015.
- Cerqueira, G. C., Bartholomeu, D. C., DaRocha, W. D., Hou, L., Freitas-Silva, D. M., Renato Machado, C., et al. **Sequence Diversity and Evolution of Multigene Families in Trypanosoma Cruzi.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 157, 65–72, 2008. doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.10.002
- CHAGAS C. & Villela E., . **Forma cardíaca da Tripanosomiase americana.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 14: 5-61, 1922.
- CHAGAS C. **A trypanosome of the Armadillo (Tatusia novemcincta), its transmission by Triatoma geniculata and the role of the tatusia as an outof-door host of Trypanosoma cruzi.** *Preliminary Communication. Bras Med* ; 30:2-4, 1912.
- CHAGAS C. **Nova entidade mórbida do homem. Rezumo geral de estudos etiológicos e clínicos.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* ; 3:219-275, 1911.
- CHAGAS C. **Nova trypanosomiase humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen. Sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 1:159-218, 1909.

CHAGAS C. **Tripanosomíase americana. Forma aguda da moléstia.** Mem Inst Oswaldo Cruz 1916; 8:37-67. 10. Chagas C, Villela E. Forma cardíaca da Tripanosomíase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz ; 14:5-61,1922

CHAGAS C. **Tripanosomíase americana. Forma aguda da moléstia.** Mem Inst Oswaldo Cruz 1916; 8:37-67. 10. Chagas C, Villela E. Forma cardíaca da Tripanosomíase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz; 14:5-61,1922

Chagas Filho, C. (1993). *Meu pai*. 293 p-293 p.

CHAGAS, C. **A new disease entity in man: A report on etiologic and clinical observations.** *International Journal of Epidemiology*, 37(4), 694–695, 2008. <https://doi.org/10.1093/ije/dyn149>

Chao, C., Leone, J. L., & Vigliano, C. A. **Chagas disease: Historic perspective.** Em *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1866, Número 5). Elsevier B.V, 2020 <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165689>

CHAPPUIS F, & JACKSON Y. **Chagas disease and african trypanosomiasis.** Jameson J, & Fauci A.S., & Kasper D.L., & Hauser S.L., & Longo D.L., & Loscalzo J(Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 20e. McGraw Hill, 2018 <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2129§ionid=192027251>

CHAVES, A.T., MENEZES, C.A.S., COSTA, H.S., NUNES, M.C.P., ROCHA, M.O.C. **Myocardial fibrosis in chagas disease and molecules related to fibrosis,** *Parasite Immunol.* 41 () 1–7, 2019, <https://doi.org/10.1111/pim.12663>.

CHEVILLARD, C., J.P.S. NUNES, A.F. FRADE, R.R. ALMEIDA, R.P. PANDEY, M. S. NASCIMENTO, J. KALIL, E. CUNHA-NETO, **Disease tolerance and pathogen resistance genes may underlie trypanosoma cruzi persistence and differential progression to chagas disease cardiomyopathy,** *Front. Immunol.* 9, 2791, 2018, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02791>.

CHOCAIR PR, SABBAGA E, AMATO NETO V, SHIROMA M, DE GOES GM. **Kidney transplantation: a new way of transmitting chagas disease.** *Rev Inst Med Trop São Paulo.* ; 23(6): 280-2,1981

Chocair PR, Sabbaga E, Amato Neto V, Shiroma M, de Goes GM. **Kidney transplantation: a new way of transmitting chagas disease.** *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1981; 23(6): 280-2.

CHOU, L. Y. T., MING, K., AND CHAN, W. C. W. **Strategies for the Intracellular Delivery of Nanoparticles.** *Chem. Soc. Rev.* 40, 233–245,2011. doi: 10.1039/c0cs00003e

CHUENKOVA, M. V., AND PEREIRA, M. A. **The T. Cruzi Trans-Sialidase Induces PC12 Cell Differentiation via MAPK/ERK Pathway.** *NeuroReport* 12 (17), 3715–3718, 2001. doi: 10.1097/00001756-200112040-00022

CHUENKOVA, M. V., FURNARI, F. B., CAVENEE, W. K., AND PEREIRA, M. A. **Trypanosoma Cruzi Trans-Sialidase: A Potent and Specific Survival Factor for Human Schwann Cells by Means of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (17), 9936–9941, 2001. doi: 10.1073/Pnas.161298398

CORTEZ, C., REAL, F., AND YOSHIDA, N. **Lysosome Biogenesis/Scattering Increases Host Cell Susceptibility to Invasion by Trypanosoma Cruzi Metacyclic Forms and Resistance to Tissue Culture Trypomastigotes.** *Cell. Microbiol.* 18 (5), 748–760, 2016. doi: 10.1111/cmi.12548

- CORTEZ, C., SOBREIRA, T. J., MAEDA, F. Y., AND YOSHIDA, N. **The Gp82 Surface Molecule of Trypanosoma Cruzi Metacyclic Forms**. *Subcellular Biochem.* 74, 137–150, 2014. doi: 10.1007/978-94-007-7305-9
- COURA JR, DIAS JC. **Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* ; 104(Suppl 1):31–40, 2009.
- COURA JR, FERREIRA LF, SAADE EA, MORTEL RE, SILVA JR. *Tentativa terapêutica com a nitrofurazona (Furacin) na forma crônica da doença de Chagas*. *O Hospital* 60: 425-429, 1961.
- Coura JR, Ferreira LF, Silva JR. **Experiências com nitrofurazona na fase crônica da doença de Chagas**. *O Hospital* 62: 957-964, 1962.
- COURA JR, SILVA JR. **Aspectos atuais do tratamento da doença de Chagas**. *Rev Bras Med* 51: 283-290, 1961.
- COURA, J. R. (2013). **The discovery of Chagas disease (1908-1909): Great successes and certain misunderstandings and challenges**. Em *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* (Vol. 46, Número 4, p. 389–390). <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0143-2013>
- COURA, J. R. **The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review**. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), 277–282, 2015. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140362>
- COURA, J. R. **The discovery of Chagas disease (1908-1909): Great successes and certain misunderstandings and challenges**. Em *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Vol. 46, Número 4, p. 389–390, 2013. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0143-2013>
- COURA, J. R., VIÑAS, P. A., & JUNQUEIRA, A. C. V. **Ecoepidemiology, Short history and control of chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries**. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(7), 856–862, 2014. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140236>
- COURA, J.R. **Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal**, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 (4), 549–554, 2009.
- COUTINHO, M., FREIRE, O., CARLOS, J., & DIAS, P **123 123 123 123 123** *Mem Inst Oswaldo Cruz. Em Rio de Janeiro* (Vol. 94), 1999.
- CREMONA, M. L., CAMPETELLA, O., SÁNCHEZ, D. O., AND FRASCH, A. C. C. **Enzymically Inactive Members of the Trans-Sialidase Family from Trypanosoma Cruzi Display b-Galactose Binding Activity**. *Glycobiology* 9, 581–587, 1999. doi: 10.1093/glycob/9.6.581
- CREMONA, M. L., SÁNCHEZ, D. O., FRASCH, A. C. C., AND CAMPETELLA, O. **A Single Tyrosine Differentiates Active and Inactive Trypanosoma Cruzi Trans-Sialidases**. *Gene* 160, 123–128, 1995. doi: 10.1016/0378-1119(95)00175-6
- CRISTOVÃO-SILVA, A. C., BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A., HERNANDES, M. Z., & PEREIRA, V. R. A. . **Chagas disease: Immunology of the disease at a glance**. Em *Cytokine and Growth Factor Reviews* (Vol. 62, p. 15–22), 2021. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.10.001>
- CRUZ, L., VIVAS, A., MONTILLA, M., HERNÁNDEZ, C., FLÓREZ, C., PARRA, E., & RAMÍREZ, J. D. **Comparative study of the biological properties of Trypanosoma**

cruzi I genotypes in a murine experimental model. *Infection, Genetics and Evolution*, 29, 110–117, 2015. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2014.11.012>

CRUZ, M. C., SOUZA-MELO, N., DA SILVA, C. V., DAROCHA, W. D., BAHIA, D., ARAÚJO, P. R., et al. **Trypanosoma Cruzi: Role of Amastin on Extracellular Amastigote Cell Invasion and Differentiation.** *PLoS One* 7 (12), e51804, 2012 doi: 10.1371/Journal.pone.0051804

CUETO, J. A., VANRELL, M. C., SALASSA, B. N., NOLA, S., GALLI, T., COLOMBO, M. I., et al. (2017). **Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptors Required during Trypanosoma Cruzi Parasitophorous Vacuole Development.** *Cell. Microbiol.* 19 (6), e12713, 2017. doi: 10.1111/cmi.12713

CRIADO, L., FLÓREZ, MARTÍN, O. J., GONZÁLEZ, C.I. **Genetic polymorphisms in TNFA/ TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population,** *Cytokine* 57: 398–401, 2012 <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.12.007>.

CUSTER B, AGAPOVA M, BRUHN R, CUSICK R, KAMEL H, TOMASULO P, et al. **Epidemiologic and laboratory findings from 3 years of testing United States blood donors for Trypanosoma cruzi.** *Transfusion*; 52: 1901-11. 2012

CUSTER B, AGAPOVA M, BRUHN R, CUSICK R, KAMEL H, TOMASULO P, et al. **Epidemiologic and laboratory findings from 3 years of testing United States blood donors for Trypanosoma cruzi.** *Transfusion.* ; 52: 1901-11, 2012

DA FONSECA, L. M., DA COSTA, K. M., DE SOUSA CHAVES, V., FREIRE-DE-LIMA, C. G., MORROT, A., MENDONÇA-PREVIATO, L., et al. **Theft and Reception of Host Cell's Sialic Acid: Dynamics of Trypanosoma Cruzi Trans-Sialidases and Mucin-like Molecules on Chagas' Disease Immunomodulation.** *Front. Immunol.* 10, 2019.00164 (February), 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.00164

DA SILVA, C. V., KAWASHITA, S. Y., PROBST, C. M., DALLAGIOVANNA, B., CRUZ, M. C., DA SILVA, E. A., SOUTO-PADRÓN, T. C. B. S., KRIEGER, M. A., GOLDENBERG, S., BRIONES, M. R. S., ANDREWS, N. W., & MORTARA, R. A. **Characterization of a 21 kDa protein from Trypanosoma cruzi associated with mammalian cell invasion.** *Microbes and Infection*, 11(5), 563–570, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.03.007>

DANIEL-RIBEIRO, C. T., & DE LIMA, A. L. G. S. **Oswaldo Gonçalves Cruz: The character, the scientist, the academician.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, 1–16, 2020. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0313-2020>

DE ARAÚJO, F.F. CORRÊA-OLIVEIRA, R., ROCHA, M.O.C., CHAVES, A.T. FIUZA, J.A., FARES, R.C. G., FERREIRA, K.S., NUNES, M.C.P., KEESSEN, T.S., DAMASIO, M.P.S., TEIXEIRA-CARVALHO, A., GOMES, J.A.S. **Foxp3 +CD25 high CD4 + regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity,** *Immunobiology* 217, 768–777, 2012 <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.04.008>.

DE ARAÚJO, F.F., LIMA TORRES, K.C., VIANA PEIXOTO, S., PINHO A.L., RIBEIRO, J., VAZ MELO MAMBRINI, V. BORTOLO REZENDE, M.L. LIMA SILVA, A.I. LOYOLA FILHO, A. TEIXEIRA-CARVALHO, M.F. LIMA-COSTA, O.A. MARTINS-FILHO, **CXCL9 and CXCL10 display an age-dependent profile in Chagas patients: a cohort study of aging in Bambuí, Brazil,** *Infect. Dis. Poverty.* 9 1–10, 2020 <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00663-w>.

- DE LANA, M., & DE MENEZES MACHADO, E. M.. **Biology of Trypanosoma cruzi and biological diversity.** Em *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition* (p. 345–369), 2017. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00016-2>
- DE MEDEIROS, C. A., DE SILVA, M. B. A., DE OLIVEIRA, A. L. S., ALVES, S. M. M., DAS DA SILVEIRA BARROS, M. N. D., DE MELO CAVALCANTI, M. D. G. A., DE OLIVEIRA, G. M. A., CARRAZZONE, C. D. F. V., DE OLIVEIRA, W. A., & DE MEDEIROS, Z. M. **Mapping the morbidity and mortality of Chagas disease in an endemic area in Brazil.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 64, 2022. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202264005>
- DE OLIVEIRA, A. B. B., ALEVI, K. C. C., IMPERADOR, C. H. L., MADEIRA, F. F., & DE AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. **Parasite-vector interaction of chagas disease: A mini-review.** Em *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (Vol. 98, Número 3, p. 653–655, 2018. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0657>
- DE OLIVEIRA, A.P., AYO, C.M., BESTETTI, R.B., BRANDÃO C.C, DE MATTOS, C.E. CAVASINI, L.C. DE MATTOS, **The role of CCR5 in Chagas disease - a systematic review,** *Infect. Genet. Evol.* 45, 132–137, 2016 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.012>.
- DE OLIVEIRA, M. T., SULLEIRO, E., GIMENEZ, A. S., DE LANA, M., ZINGALES, B., DA SILVA, J. S., MARIN-NETO, J. A., & MOLINA, I. **Quantification of parasite burden of trypanosoma cruzi and identification of discrete typing units (Dtus) in blood samples of latin american immigrants residing in Barcelona, Spain.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(6), 1–14, 2020a. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008311>
- DE OLIVEIRA, M. T., SULLEIRO, E., GIMENEZ, A. S., DE LANA, M., ZINGALES, B., DA SILVA, J. S., MARIN-NETO, J. A., & MOLINA, I. **Quantification of parasite burden of trypanosoma cruzi and identification of discrete typing units (Dtus) in blood samples of latin american immigrants residing in Barcelona, Spain.** Em *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Public Library of Science, 2020b, junho 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008311>
- DE PAIVA, R. M. C., GRAZIELLE-SILVA, V., CARDOSO, M. S., NAKAGAKI, B. N., MENDONÇA NETO, R. P., CANAVACI, A. M. C., et al. **Amastin Knockdown in Leishmania Braziliensis Affects Parasite-Macrophage Interaction and Results in Impaired Viability of Intracellular Amastigotes.** *PLoS Pathog.* 11 (12), e1005296, 2015. doi: 10.1371/journal.ppat.1005296
- Delaporte, F. *A doença de Chagas: história de uma calamidade continental.* 130–130, 2003.
- DIAS E. **Estudos sobre o Schizotrypanum cruzi.** Rio de Janeiro: Universidade de Rio de Janeiro, 1933.
- DIAS J, SCHOFIELD C. **The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* ;94(Suppl 1):103–21, 1999

DIAS JC, PRATA A, CORREA D. **Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis.** Rev Soc Bras Med Trop; 41:193–6, 2008

DIAS JCP, SCHOFIELD CJ. **History of Chagas disease as a public health problem in Latin America.** In: Teixeira CA, Vinaud M, editors. Emerging Chagas Disease. Sharjah: Bentham Science Publisher. p. 1–9, 2011

DIAS, J. C. P. **Evolution of Chagas Disease Screening Programs and Control Programs Historical Perspective.** Em *Global Heart* (Vol. 10, Número 3, p. 193–202, 2015. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.gheart.2015.06.003>

DIKIC, I., AND ELAZAR, Z. **Mechanism and Medical Implications of Mammalian Autophagy.** Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 19, 349–364, 2018. doi: 10.1038/s41580-018-0003-4

DO, V., SOUZA, C.G., DOS SANTOS, J.T., CABRAL, F.L., BARBISAN, F. AZEVEDO, M.I., DIAS CARLI, L.F., DE AVILA BOTTON, S., DOS SANTOS JAQUES, J.A., D.B.ROSA LEAL, **Evaluation of P2×7 receptor expression in peripheral lymphocytes and immune profile from patients with indeterminate form of Chagas disease,** Microb. Pathog. 104, 32–38, 2017 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.002>.

DOCAMPO R, MORENO SNJ. **Free radicals' metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on Trypanosoma cruzi.** Rev Infect Dis ;6:233–8, 1984

DORTA, M. L., FERREIRA, A. T., OSHIRO, M. E. M., AND YOSHIDA, N. **Ca²⁺ Signal Induced by Trypanosoma Cruzi Metacyclic Trypomastigote Surface Molecules Implicated in Mammalian Cell Invasion.** Mol. Biochem. Parasitol. 73 (1–2), 285–289, 1995. doi: 10.1016/0166-6851(94)00123-5

DUMOULIN, P. C., & BURLEIGH, B. A. **Stress-induced proliferation and cell cycle plasticity of intracellular Trypanosoma cruzi amastigotes.** *mBio*, 9(4), 2018. <https://doi.org/10.1128/mBio.00673-18>

DYE-BRAUMULLER, K. C., LYNN, M. K., & NOLAN, M. S. **History of indigenous Trypanosoma cruzi infection in humans, animals and triatomines in California, USA.** Em *Zoonoses and Public Health* (Vol. 68, Número 4, p. 299–308). John Wiley and Sons Inc, 2021. <https://doi.org/10.1111/zph.12797>

ECHAVARRÍA, N. G., ECHEVERRÍA, L. E., STEWART, M., GALLEGO, C., & SALDARRIAGA, C. **Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy.** Em *Current Problems in Cardiology*. Vol. 46, Número 3, 2021. Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2019.100507>

ECHEVERRIA, L. E., & MORILLO, C. A. **American Trypanosomiasis (Chagas Disease).** Em *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 33, Número 1, p. 119–134). W.B. Saunders, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.015>

FAIRLAMB, A. H., & CERAMI, A. **Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida.** *https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.003403*, 46, 695–729, 2003. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MI.46.100192.003403>

FELICIANO, W. D., YOSHIDA, S., STRAIGHT, S. W., AND SWANSON, J. A. **Coordination of the Rab5 Cycle on Macropinosomes.** Traffic 12, 1911–1922, 2011 doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01280.x

- FELLET, M. R., LORENZO, M. G., ELLIOT, S. L., CARRASCO, D., & GUARNERI, A. A. **Effects of infection by Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli on the reproductive performance of the vector Rhodnius prolixus.** *PLoS ONE*, 9(8), 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105255>
- FERNANDES, M. C., CORTEZ, M., FLANNERY, A. R., TAM, C., MORTARA, R. A., AND ANDREWS, N. W. **Trypanosoma Cruzi Subverts the Sphingomyelinase-Mediated Plasma Membrane Repair Pathway for Cell Invasion.** *J. Exp. Med.* 208 (5), 909–921, 2011. doi: 10.1084/jem.20102518
- FERNANDES, O., MANGIA, R. H., LISBOA, C. V., PINHO, A. P., MOREL C. M., ZINGALES, B., CAMPBELL, D. A., JANSEN, A. M. **The complexity of the sylvatic cycle of Trypanosoma cruzi in Rio de Janeiro state (Brasil) revealed by the non-transcribed spacer of mini-exon gene.** *Parasitology* 118, 161-166,1999.
- FERNANDES, O., MANGIA, R. H., LISBOA, C. V., PINHO, A. P., MOREL C. M., ZINGALES, B., CAMPBELL, D. A., JANSEN, A. M. **The complexity of the sylvatic cycle of Trypanosoma cruzi in Rio de Janeiro state (Brasil) revealed by the non-transcribed spacer of mini-exon gene.** *Parasitology* 118, 161-166,1999.
- FERREIRA HO, PRATA A, RASSI A. **Administração prolongada de nitrofurazona no tratamento da doença de Chagas aguda.** *O Hospital* 63: 131-13, 1963.
- FERREIRA HO. **Fase aguda da doença de Chagas.** *O Hospital* 61: 307-311, 1962.
- FERREIRA HO. **Forma aguda da doença de Chagas tratada pela nitrofurazona.** *Rev Inst Med Trop São Paulo* 3: 287-289, 1961.
- FERREIRA, É. R., HORJALES, E., BONFIM-MELO, A., CORTEZ, C., DA SILVA, C. V., DE GROOTE, M., et al. **Unique Behavior of Trypanosoma Cruzi Mevalonate Kinase: A Conserved Glycosomal Enzyme Involved in Host Cell Invasion and Signaling.** *Sci. Rep.* 6 (April), 1–13, 2016. doi: 10.1038/srep2461
- FERREIRA, H.D. **Clinico-therapeutic trial with benzonidazole in Chagas' disease,** *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 18 (5), 357–364, 1976
- FERREIRA,D., CORTEZ,M., ATAYDE,V.D., ANDYOSHIDA, N. **Actin Cytoskeleton-Dependent and -Independent Host Cell Invasion by Trypanosoma Cruzi Is Mediated by Distinct Parasite Surface Molecules.** *Infect. Immun.* 74 (10), 5522–5528, 2006. doi: 10.1128/IAI.00518-06
- FERRI, G., & EDREIRA, M. M. **All Roads Lead to Cytosol: Trypanosoma cruzi Multi-Strategic Approach to Invasion.** Em *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A., 2021 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.634793>
- FILARDI, L.S., BRENER, Z. **Susceptibility and natural resistance of Trypanosoma cruzi strains to drugs used clinically in Chagas disease,** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81 (5) 755–759, 1987.
- FLORENTINO, P. T. V., REAL, F., ORIKAZA, C. M., DA CUNHA, J. P. C., VITORINO, F. N. L., CORDERO, E. M., et al. **A Carbohydrate Moiety of Secreted Stage-Specific Glycoprotein 4 Participates in Host Cell Invasion by Trypanosoma Cruzi Extracellular Amastigotes.** *Front. Microbiol.* 9, 2018.00693 (APR), 2018. doi: 10.3389/Fmicb.2018.00693
- FRANCO-PAREDES, C., VILLAMIL-GÓMEZ, W. E., SCHULTZ, J., HENAO-MARTÍNEZ, A. F., PARRA-HENAO, G., RASSI, A., RODRÍGUEZ-MORALES, A. J., & SUAREZ, J. A. **A deadly feast: Elucidating the burden of orally acquired acute Chagas disease in Latin America – Public health and travel medicine importance.** Em

- Travel Medicine and Infectious Disease* (Vol. 36). Elsevier USA, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101565>
- FRIEDRICH, N., HAGEDORN, M., SOLDATI-FAVRE, D., AND SOLDATI, T. Prison Break: Pathogens' Strategies To Egress from Host Cells. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 707–720, 2012. doi: 10.1128/membr.00024-12
- GÓMEZ-OLARTE, S. BOLÁNOS, N.I., ECHEVERRY, M., RODRÍGUEZ, A.N. CU'ELLAR, A., PUERTA, C. J., MARÍNO, A. GONZALEZ, J.M. **Intermediate monocytes and cytokine production associated with severe forms of Chagas disease**, *Front. Immunol.* 10 1671, 2019 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01671>.
- GALVÃO, C., & JUSTI, S. A. **An overview on the ecology of Triatominae (Hemiptera:Reduviidae).** *Acta Tropica*, 151(1), 116–125, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.006>
- GAO, W., PEREIRA, M.A. **Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to Trypanosoma cruzi**, *Int. J. Parasitol.* 32: 167–170, 2002
- GARCÍA-HUERTAS, P., & CARDONA-CASTRO, N. **Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants and targets.** Em *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 142). Elsevier Masson s.r.l., 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112020>
- GAZZINELLI, R.T., DENKERS, E.Y. **Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism**, *Nat. Rev. Immunol.* 6, 895–906, 2006 <https://doi.org/10.1038/nri1978>.
- GIORDANO, R., FOUTS, D. L., TEWARI, D., COLLI, W., MANNING, J. E., AND ALVES, M. J. M. (1999). **Cloning of a Surface Membrane Glycoprotein Specific for the Infective Form of Trypanosoma Cruzi Having Adhesive Properties to Laminin.** *J. Biol. Chem.* 274 (6), 3461–3468. doi: 10.1074/jbc.274.6.3461
- GOES, G. R., ROCHA, P. S., DINIZ, A. R. S., AGUIAR, P. H. N., MACHADO, C. R., AND VIEIRA, L. Q. **Trypanosoma Cruzi Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages.** *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (4), e0004555, 2016. doi: 10.1371/journal.pntd.0004555
- GONZÁLEZ, F.B., VILLAR, S.R., FERNÁNDEZ BUSSY, R., MARTIN, G.H., PÉROL, L., MANARIN, R., SPINELLI, S.V., PILON, C., COHEN, J.L., BOTTASSO, O.A., PIAGGIO, E., PÉREZ, A.R. **Immunoendocrine dysbalance during uncontrolled T. cruzi infection is associated with the acquisition of a Th-1-like phenotype by Foxp3+ T cells**, *Brain. Behav. Immun.* 45 219–232, 2015 <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.11.016>.
- GORLA NB, LEDESMA O, BARBIERI G, et al. **Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox.** *Mutat Res* ; 224:263–7, 1989.
- GORLA NB, Ledesma OS, Barbieri G, et al. **Assessment of cytogenetic damage in chagasic children treated with benznidazole.** *Mutat Res* ;206:212–20, 1988
- GORLA, D., & HASHIMOTO, K. **Control strategies against Triatominae.** *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition*, 223–242, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00010-1>
- GORLA, D., PONCE, C., DUJARDIN, J. P., & SCHOFIELD, C. J. **Control strategies against triatominae.** Em *American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred*

- Years of Research* (p. 233–245). Elsevier, 2010. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384876-5.00010-1>
- GUARNERI, A. A., & LORENZO, M. G. **Triatomine physiology in the context of trypanosome infection.** *Journal of Insect Physiology*, 97, 66–76, 2017. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2016.07.005>
- GUEDES, P.M.M., DE ANDRADE, C.M., NUNES, D.F., DE SENA PEREIRA N., QUEIROGA, T.B. D., MACHADO-COELHO, G.L.L., NASCIMENTO, M.S.L., DO-VALLE-MATTA, M.A., DA CÂMARA, A.C.J., CHIARI, E., DA, L.M., GALVÃO, C. **Inflammation enhances the risks of stroke and death in chronic Chagas disease patients,** PLoS Negl. Trop. Dis. 10, 1–18, 2016, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004669>.
- GUEDES, P.M.M., GUTIERREZ, F.R.S., SILVA, G.K., DELLALIBERA-JOVILIANO, R., RODRIGUES, G. J., BENDHACK, L.M., RASSI, A., 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, 1630, 2012 <https://doi.org/10.1371/Journal.pntd.0001630>.
- GUHL, F., & RAMÍREZ, J. D. **Trypanosoma cruzi I diversity: Towards the need of genetic subdivision?** In *Acta Tropica* (Vol. 119, Issue 1, pp. 1–4), 2011. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.04.002>
- GUMIEL, M., DA MOTA, F. F., RIZZO, V. D. S., SARQUIS, O., CASTRO, D. P. DE, LIMA, M. M., GARCIA, E. D. S., CARELS, N., & AZAMBUJA, P. **Characterization of the microbiota in the guts of Triatoma brasiliensis and Triatoma pseudomaculata infected by Trypanosoma cruzi in natural conditions using culture independent methods.** *Parasites and Vectors*, 8(1), 2015. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0836-z>
- GURGEL-GONÇALVES, R., GALVÃO, C., COSTA, J., PETERSON, T.A., **Geographic distribution of chagas disease vectors in brazil based on ecological niche modeling.** *J. Trop. Med.* 201, 2, 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/705326>
- HALL, B.F., WEBSTER, P., MA, A. K., JOINER, K. A., AND ANDREWS, N. W. **Desialylation of Lysosomal Membrane Glycoproteins by Trypanosoma Cruzi: A Role for the Surface Neuraminidase in Facilitating Parasite Entry into the Host Cell Cytoplasm.** *J. Exp. Med.* 176 (2), 313–325, 1992. doi: 10.1084/jem.176.2.313
- HALL, B.S. BOT, C. WILKINSON, S.R. **Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites,** *J. Biol. Chem.* 286 (15) 13088–13095, 2011.
- HALL, B.S., WILKINSON, S.R. **Activation of benzimidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation,** *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (1) 115–123, 2012.
- HAMILTON PB, GIBSON WC, STEVENS JR: **Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies.** *Mol Phylogenet Evol* , 44:15–25, 2007.
- HAMILTON PB, STEVENS JR, GAUNT MW, GIDLEY J, GIBSON WC: **Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA.** *Int J Parasitol* , 34:1393–1404, 2004.

- HAMILTON, P. B., & STEVENS, J. R. **Classification and phylogeny of *Trypanosoma cruzi***. Em *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition* (p. 321–344). Elsevier Inc, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00015-0>
- HAMILTON, P. B., TEIXEIRA, M. M. G., & STEVENS, J. R. **The evolution of *Trypanosoma cruzi*: The “bat seeding” hypothesis**. Em *Trends in Parasitology*. Vol. 28, Número 4, p. 136–141, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.01.006>
- HARDISON, J.L., WRIGHTSMAN, R.A., CARPENTER, P.M., LANE, T.E. MANNING, J.E. **The chemokines CXCL9 and CXCL10 promote a protective immune response but do not contribute to cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi***, *Infect. Immun.* 74:125–134, 2006 <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.125-134.2006>.
- HIDRON, A., VOGENTHALER, N., SANTOS-PRECIADO, J. I., RODRIGUEZ-MORALES, A. J., FRANCO-PAREDES, C., & RASSI, A. (2010). **Cardiac involvement with parasitic infections**. Em *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 23, Número 2, p. 324–349). <https://doi.org/10.1128/CMR.00054-09>
- HIYAMA, K. HAMANO, S., NAKAMURA, T, NOMOTO, K., Tada, I, **IL-4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection**, *Parasitol. Res.* 87, 269–274, 2001 <https://doi.org/10.1007/PL00008577>.
- HONORATO, N. R. M., DA SILVA, A. N. B., DE NEGREIROS, C. C. A., AGUIAR, L. M. A., MARLIÉRE, N. P., DE SOUZA, R. DE C. M., SOUZA E GUIMARÃES, R. J. DE P., GALVÃO, L. M. DA C., & DA CÂMARA, A. C. J. **Triatomine and *Trypanosoma cruzi* discrete typing units distribution in a semi-arid area of northeastern Brazil**. *Acta Tropica*, 220, 105950, 2021. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2021.105950>
- HOTEZ PJ, DUMONTEIL E, WOC-COLBURN L, SERPA JA, BEZEK S, EDWARDS MS, et al. **Chagas disease: “the new HIV/AIDS of the Americas.”** *PLoS Negl Trop Dis.* 6:4–7, 2012 doi: 10.1371/journal.pntd.0001498
- HOWARD EJ, XIONG X, CARLIER Y, SOSA-ESTANI S, BUEKENS P. **Frequency of the Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis**. *Brit J Obst Gynecol.*; 121(1): 22-33, 2014. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00322-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00322-8).
- IMAI K, MAEDA T, SAYAMA Y, MIKITA K, FUJIKURA Y, MISAWA K, ET AL. **Mother-to-child transmission of congenital chagas disease**, *Japan. Emerg Infect Dis.* 20:146–8, 2014. doi: 10.3201/eid2001.131071
- JACKSON Y, PINTO A, PETT S. **Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions**. *Trop Med Int Health.* 2014; 19: 212–8.
- JANSEN, A. M., XAVIER, S. C. C., & ROQUE, A. L. R. **The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment**. *Acta Tropica*, 151(1), 1–15, 2015. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2015.07.018>
- JANSEN, A. M., XAVIER, S. C. DAS C., & ROQUE, A. L. R. **Landmarks of the Knowledge and *Trypanosoma cruzi* Biology in the Wild Environment**. *Frontiers in*

- Cellular and Infection Microbiology*, 10, 10, 2020.
<https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00010/BIBTEX>
- JENWITHEESUK, E., HORST, J.A. RIVAS, K.L.VAN VOORHIS, W.C. R. SAMUDRALA, **Novel paradigms for drug discovery: computational multitarget screening**, *Trends Pharmacol. Sci.* 29 (2) 62–71, 2008
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.11.007>.
- KANGUSSU-MARCOLINO, M. M., PAIVA, R. M. C. DE ARAÚJO, P. R., DE MENDONÇA-NETO, R. P., LEMOS, L., BARTHOLOMEU, D. C., et al.. **Distinct Genomic Organization, MRNA Expression and Cellular Localization of Members of Two Amastin Sub-Families Present in Trypanosoma cruzi**. *BMC Microbiol.* 13, 10, 2013. doi: 10.1186/1471-2180-13-10
- KAY, R. R., WILLIAMS, T. D., AND PASCHKE, P. **Amplification of Pip3 Signalling by Macropinocytic Cups**. *Biochem. J.* 475, 643–648. 2018 doi: 10.1042/BCJ20170785
- KING, J. S., AND KAY, R. R. (). **The Origins and Evolution of Macropinocytosis**. *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* 374, 20180158, 2019. doi: 10.1098/rstb.2018.0158
- KINOSHITA-YANAGA, A. T., TOLEDO, M. J. D. O., DE ARAÚJO, S. M., VIER, B. P., & GOMES, M. L. **Accidental infection by Trypanosoma cruzi follow-up by the polymerase chain reaction: Case report**. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 51(5), 295–298. 2009 <https://doi.org/10.1590/S0036-46652009000500011>
- KNOX RJ, KNIGHT RC, EDWARDS DI. **Interaction of nitroimidazole drugs with DNA in vitro: structure-activity relationship**. *Br J Cancer* ;44:741–5, 1981.
- KROPF, S. P., & LACERDA, A. L. DE. **Vida pessoal = Personal life**. Em *Carlos Chagas, um cientista do Brasil = Carlos Chagas, scientist of Brazil* (p. 260–279). Editora FIOCRUZ, 2009. <https://doi.org/10.7476/9786557080009.0015>
- KROPF, S. P., & LIMA, N. T. **The history of chagas disease: Reflections on science in action**. Em *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* (Vol. 116, Número 1). Fundacao Oswaldo Cruz, 2021. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200372>
- KROPF, S. P., & SÁ, M. R.. **The discovery of Trypanosoma cruzi and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil**. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 16(SUPPL. 1), 13–34, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0104-59702009000500002>
- KULKARNI, M.M.; OLSON, C.L.; ENGMAN, D.M.; MCGWIRE, B.S. **Trypanosoma cruzi GP63 Proteins Undergo Stage-Specific Differential Posttranslational Modification and Are Important for Host Cell Infection**. *Infect. Immun.*, 77, 2193–2200. 2009.
- KUMAR, M., MAKHAL, B. GUPTA, V.K. SHARMA, A. **In silico investigation of medicinal spectrum of imidazo-azines from the perspective of multitarget screening against malaria, tuberculosis and Chagas disease**, *J. Mol. Graph. Model.* 50, 1–9, 2014 <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2014.02.006>.
- LANA M, TAFURI WL. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. In: Neves DP, organizador. *Parasitologia humana*. São Paulo: Editora Atheneu; p. 73- 96, 2000.
- LANDER, N., CHIURILLO, M.A., DOCAMPO, R. **Genome Editing by CRISPR/Cas9 in Trypanosoma cruzi**. *Methods Mol. Biol.* 1955, 61–76, 2019. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9148-8_5
- LANDER, N., LI, Z.H., NIYOGI, S., DOCAMPO, R.. **CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in Trypanosoma cruzi Reveals**

- Their Role in Flagellar Attachment.** MBio 6. 2015
<https://doi.org/10.1128/MBIO.01012-15>
- LANNES-VIEIRA J, DE ARAÚJO-JORGE TC, DE NAZARÉ CORREIA SOEIRO M, GADELHA P, CORRÊA-OLIVEIRA R. **The centennial of the discovery of Chagas disease: Facing the current challenges.** PLoS Neglect Trop Dis. 4:4–7, 2010.doi: 10.1371/journal.pntd.0000645
- LENT, H., WYGODZINSKY, P. **Revision of the Triatominae (Hemiptera: reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease.** Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 163, 123–520, 1979
- LEÓN, C. M., MONTILLA, M., VANEGAS, R., CASTILLO, M., PARRA, E., & RAMÍREZ, J. D. **Murine models susceptibility to distinct Trypanosoma cruzi I genotypes infection.** Parasitology, 144(4), 512–519, 2017.
<https://doi.org/10.1017/S0031182016001980>
- LEWINSOHN, R. **The discovery of trypanosoma cruzi and of american trypanosomiasis(Foot-notes to the history of chagas’s disease).** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 73(5), 513–522, 1979.
[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(79\)90042-7/2/73-5-513.PDF.GIF](https://doi.org/10.1016/0035-9203(79)90042-7/2/73-5-513.PDF.GIF)
- LEWINSOHN, R. **Carlos Chagas and the discovery of Chagas’ disease (American trypanosomiasis).** Journal of the Royal Society of Medicine, 74(6), 451, 1981.
<https://doi.org/10.1177/014107688107400612>
- LEWINSOHN, R. **Prophet in his own country: Carlos Chagas and the Nobel Prize.** Perspectives in biology and medicine, 46(4), 532–549, 2003.
<https://doi.org/10.1353/pbm.2003.0078>
- LEWIS MD, LLEWELLYN MS, YEO M, ACOSTA N, GAUNT MW, et al. (2011) **Recent, Independent and Anthropogenic Origins of Trypanosoma cruzi Hybrids.** PLOS Neglected Tropical Diseases 5(10): e1363, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001363>
- LEY V, ROBBINS ES, NUSSENZWEIG V, ANDREWS NW. **The exit of Trypanosoma cruzi from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments.** J ExpMed 171:401–413, 1990. <https://doi.org/10.1084/jem.171.2.401>.
- LIDANI, K. C. F., ANDRADE, F. A., BAVIA, L., DAMASCENO, F. S., BELTRAME, M. H., MESSIAS-REASON, I. J., & SANDRI, T. L. **Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem.** Journal of Physical Oceanography, 49(6), 166, 2019.
<https://doi.org/10.3389/FPUBH.2019.00166/BIBTEX>
- LIMA, L., SILVA, F. M. DA, NEVES, L., ATTÍAS, M., TAKATA, C. S. A., CAMPANER, M., DE SOUZA, W., HAMILTON, P. B., & TEIXEIRA, M. M. G. (2012). **Evolutionary Insights from Bat Trypanosomes: Morphological, Developmental and Phylogenetic Evidence of a New Species, Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi sp. nov., in African Bats Closely Related to Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi and Allied Species.** Protist, 163(6), 856–872, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.12.003>
- LLEWELLYN, M. S., MILES, M. A., CARRASCO, H. J., LEWIS, M. D., YEO, M., VARGAS, J., TORRICO, F., DIOSQUE, P., VALENTE, V., VALENTE, S. A., & GAUNT, M. W. **Genome-scale multilocus microsatellite typing of Trypanosoma cruzi**

discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. PLoS Pathogens, 5(5), 2009
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000410>

LÓPEZ-MONTEON, A., DUMONTEIL, E., & RAMOS-LIGONIO, A. ([s.d.]). *More than a Hundred Years in the Search for an Accurate Diagnosis for Chagas Disease: Current Panorama and Expectations.* www.intechopen.com

MACHADO CA, AYALA FJ: **Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of Trypanosoma cruzi.** Proc Natl Acad Sci U S A , 98:7396-7401, 2001.

MACHADO FC, CRUZ L, DA SILVA AA, CRUZ MC, MORTARA RA, ROQUE-BARREIRA MC, DA SILVA CV. **Recruitment of galectin-3 during cell invasion and intracellular trafficking of Trypanosoma cruzi extracellular amastigotes.** Glycobiology. Feb;24(2):179-84, 2014. doi: 10.1093/glycob/cwt097. Epub 2013 Nov 12. PMID: 24225883.

MACHADO, F.S., MARTINS, G. A, ALIBERTI, J.C., MESTRINER, F.L., CUNHA, F.Q., SILVA, J.S. **Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity,** Circulation 102: 3003–3008, 2000 <https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.24.3003>.

MAEDA, F. Y., CORTEZ, C., AND YOSHIDA, N. Cell Signaling during Trypanosoma Cruzi Invasion. Front. Immunol. 3361, 2012. doi: 10.3389/fimmu.2012.00361

MAGALHÃES, L.M.D., VILLANI, F.N.A., DO, M., NUNES, C.P., GOLLOB, K.J., ROCHA, M.O.C., DUTRA, W.O. **High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease,** J. Infect. Dis. 207, 661–665, 2013 <https://doi.org/10.1093/infdis/jis724>.

MAGANTO-GARCIA, E., PUNZON, C., TERHORST, C., AND FRESNO, M. **Rab5 Activation by Toll-Like Receptor 2 Is Required for Trypanosoma Cruzi Internalization and Replication in Macrophages.** Traffic 9, 1299–1315, 2008. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00760.x

MAGDESIAN, M. H., TONELLI, R. R., FESSEL, M. R., SILVEIRA, M. S., SCHUMACHER, R. I., LINDEN, R., et al. **A Conserved Domain of the Gp85/Trans-Sialidase Family Activates Host Cell Extracellular Signal-Regulated Kinase and Facilitates Trypanosoma Cruzi Infection.** Exp. Cell Res. 313 (1), 210–218, 2007.

MÁLAGA, S., AND YOSHIDA, N. **Targeted Reduction in Expression of Trypanosoma Cruzi Surface Glycoprotein Gp90 Increases Parasite Infectivity.** Infect. Immun. 69 (1), 353–359, 2001. doi: 10.1128/IAI.69.1.353-359.2001

MANNING-CELA, R., CORTÉS, A., GONZÁLEZ-REY, E., VAN VOORHIS, W. C., SWINDLE, J., AND GONZÁLEZ, A. **LYT1 Protein Is Required for Efficient In Vitro Infection by Trypanosoma cruzi.** Infect. Immun. 69 (6), 3916–3235, 2001. doi: 10.1128/IAI.69.6.3916

MARTÍN-ESCOLANO, J., MARÍN, C., ROSALES, M. J., TSAOUSIS, A. D., MEDINA-CARMONA, E., & MARTÍN-ESCOLANO, R. **An Updated View of the Trypanosoma cruzi Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment.** Em *ACS Infectious Diseases* (Vol. 8, Número 6, p. 1107–1115). American Chemical Society, 2022. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00123>

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

MARTINS, N. O., DE SOUZA, R. T., CORDERO, E. M., MALDONADO, D. C., CORTEZ, C., MARINI, M. M., et al. **Molecular Characterization of a Novel Family of Trypanosoma Cruzi Surface Membrane Proteins (TcSMP) Involved in Mammalian Host Cell Invasion.** *PLoS Neglect. Trop. Dis.* 9 (11), 1–28, 2015. doi: 10.1371/journal.pntd.0004216

MARTINS, R. M., ALVES, R. M., MACEDO, S., AND YOSHIDA, N. **Starvation and Rapamycin Differentially Regulate Host Cell Lysosome Exocytosis and Invasion by Trypanosoma Cruzi Metacyclic Forms.** *Cell. Microbiol.* 13 (7), 943–954, 2011. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01590.x

MARTINS-MELO FR, LIMA MS, RAMOS JR AN, ALENCAR CH, HEUKELBACH J. **Systematic review prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of Trypanosoma cruzi in Brazil: a systematic review and meta-analysis.** *Trop Med Int Health.* : 19: 943-57, 2014

MATTOS, E. C., TONELLI, R. R., COLLI, W., AND ALVES, M. J. M. **The Gp85 Surface Glycoproteins from Trypanosoma Cruzi.** *Sub Cellular Biochem.* 74, 151–180, 2014. doi: 10.1007/978-94-007-7305-9_7

MAYER H. **Infecção experimental con Trypanosoma cruzi por via digestiva.** *An Inst Med Region.* 5:43–8, 1961.

MAYER M, ROCHA LIMA H. **Zur Entwicklung von Schizotrypanum cruzi in Saengatiern.** *Arch Schiffsu Tropen Hyg* 16: 90-94, 1912.

MAYER M, ROCHA LIMA H . **Zum Verhalten von Schizotrypanum cruzi in Warmbluetern und Arthropoden.** *Arch Schiffsu Tropen-Hyg* 5: 101-136, 1914

MEJIA AM, HALL BS, TAYLOR MC, GÓMEZ-PALACIO A, WILKINSON SR, TRIANA-CHÁVEZ O, KELLY JM. **Benznidazole-resistance in Trypanosoma cruzi is a readily acquired trait that can arise independently in a single population.** *J Infect Dis.* Jul 15;206(2):220-8, 2012 doi: 10.1093/infdis/jis331. Epub 2012 May 2. PMID: 22551809; PMCID: PMC3379838.

MENEZES, C.A.S., ROCHA, M.O.C., P.E.A. SOUZA, A.C.L. CHAVES, K.J. GOLLOB, W. O. DUTRA, **Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression,** *Clin. Exp. Immunol.* 137:129–138, 2004 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02479.x>.

MESQUITA, R. D., VIONETTE-AMARAL, R. J., LOWENBERGER, C., RIVERA-POMAR, R., MONTEIRO, F. A., MINX, P., SPIETH, J., CARVALHO, A. B., PANZERA, F., LAWSON, D., TORRES, A. Q., RIBEIRO, J. M. C., SORGINE, M. H. F., WATERHOUSE, R. M., MONTAGUE, M. J., ABAD-FRANCH, F., ALVES-BEZERRA, M., AMARAL, L. R., ARAUJO, H. M., ... OLIVEIRA, P. L. **Genome of Rhodnius prolixus, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*

- of the United States of America, 112(48), 14936–14941, 2015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506226112>
- MILES MA, TOYE PJ, OSWALD SC, GODFREY DG. **The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of Trypanosoma cruzi, circulating independently in a rural area of Brazil.** Trans R Soc Trop Med Hyg ;71(3):217-25, 1977
- MING, M., CHUENKOVA, M., ORTEGA-BARRIA, E., AND PEREIRA, M. E. A. **Mediation of Trypanosoma Cruzi Invasion by Sialic Acid on the Host Cell and Trans-Sialidase on the Trypanosome.** Mol. Biochem. Parasitol. 59, 243– 252, 1993. doi: 10.1016/0166-6851(93)90222-J
- NARDY, A. F. F. R., FREIRE-DE-LIMA, C. G., PÉREZ, A. R., AND MORROT, A. **Role of Trypanosoma Cruzi Trans-Sialidase on the Escape from Host Immune Surveillance.** Front. Microbiol. 7, 348, 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.00348
- NOGUEIRA, L.G., SANTOS, R.H.B., IANNI, B.M., FIORELLI, A.I., MAIRENA, E.C., BENVENUTI, L. A., FRADE, A., DONADI, E., DIAS, F., SABA, B., WANG, H.T.L., FRAGATA, A., SAMPAIO, M., HIRATA, M.H., BUCK, P., MADY, C. BOCCHI, E.A., STOLF, N.A., KALIL, J., CUNHA-NETO, E. **Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10,** PLoS Negl. Trop. Dis. 6:1867, 2012, <https://doi.org/10.1371/journal.Pntd.0001867>.
- NOIREAU F. **Wild Triatoma infestans, a potential threat that needs to be monitored.** Mem Inst Oswaldo Cruz 104 (Suppl. I): 60-64, 2009
- NOIREAU, F., DIOSQUE, P., & JANSEN, A. M. **Trypanosoma cruzi: Adaptation to its vectors and its hosts.** Em *Veterinary Research.* Vol. 40, Número 2, 2009. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009009>
- NOUVELLET, P., RAMIREZ-SIERRA, M. J., DUMONTEIL, E., & GOURBIÈRE, S. **Effects of genetic factors and infection status on wing morphology of Triatoma dimidiata species complex in the Yucatán peninsula, Mexico.** *Infection, Genetics and Evolution*, 11(6), 1243–1249, 2011. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2011.04.008>
- NUSSEINZWEIG V, KLOETZEL J, DEANE LM. **Acquired immunity in mice infected with strains of immunological types A and B of Trypanosoma cruzi.** Exp Parasitol 14: 233-239, 1963
- NUSSENZWEIG V, SONNTAG R, BIANCALANA A, FREITAS JLP, AMATO NETO V, KLOETZEL J. **Ação da violeta de genciana sobre o T. cruzi in vitro: sua importância na esterilização do sangue destinado à transfusão.** Rev Paul Med 42: 57-58, 1953.
- NUSSENZWEIG, V., & GOBLE, F. C. **Further studies on the antigenic constitution of strains of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi.** *Experimental Parasitology*, 18(2), 224–230, 1966. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(66\)90020-8](https://doi.org/10.1016/0014-4894(66)90020-8)
- NUSSENZWEIG, V., DEANE, L. M., & KLOETZEL, J. **Differences in antigenic constitution of strains of Trypanosoma cruzi.** *Experimental parasitology*, 14(2), 221–232, 1963. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(63\)90027-4](https://doi.org/10.1016/0014-4894(63)90027-4)
- OLIVEIRA, A.C., DE ALENCAR, B.C., TZELEPIS, F., KLEZEWSKY, W., DA SILVA, R.N., NEVES, F.S., CAVALCANTI, G.S, BOSCARDIN, S., NUNES, M.P., SANTIAGO, M.F., N´OBREGA, A. RODRIGUES, M.M., BELLIO, M **Impaired innate**

immunity in Tlr4-/- mice but preserved CD8+ T cell responses against trypanosoma cruzi in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9-or myd88-deficient mice, PLoS Pathog. 6, 1–16, 2010 <https://doi.org/10.1371/Journal.ppat.1000870>.

OLIVEIRA, A.-C., PEIXOTO, J.R., DE ARRUDA, L.B., CAMPOS, M.A, GAZZINELLI, R.T., GOLENBOCK, D T. AKIRA, S. PREVIATO, J.O. MENDONÇA-PREVIATO, L.. NOBREGA, A BELLIO, M. **Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to trypanosoma cruzi glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi***, J. Immunol. 173, 5688–5696, 2004 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.9.5688>.

OPAS/OMS **Tratamiento Etiológico de la Enfermedad de Chagas. Conclusiones de una consulta técnica.** OPC/HCP/ HCT/140/99, 32 pp. (published in Rev Patol Trop 28: 247-279, 1998.

Organización Panamericana de la Salud (OPAS). **Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas.** Washington, DC: OPS/HDM/CD/425-06; 2006.

ORTEGA ZAMORA, Y., ESCAMILLA ROJAS, L.J., VILLA SANDOVAL, E.M. VELA PORRAS, J.S., COSSIO CONTRERA, E. Y., CUBIDES ROMERO, S.S., CARREÑO RAMIREZ, P.D., URRIAGO LOSADA, H., DE LOS RIOS, C., GOMEZ MAHECHA, D.A. LOVERA SERRANO, K.D. BARRETO MONTAÑA, J.C. NARVAEZ CAICEDO, V.L. GUTIERREZ, F.R.S. **Chagas disease immunogenetics: elusive markers of disease progression**, Expert Rev. Cardiovasc. Ther. 15 367–376, 2017 <https://doi.org/10.1080/14779072.2017.1317591>

PACKCHANIAN A. **Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofurantoin compounds.** J Parasitol 38: 30-40, 1952.

PACKCHANIAN A. **Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofurantoin compounds.** Antibiotics & Chemotherapy 7: 13-23, 1957.

PAIVA, C. N., FEIJÓ, D. F., DUTRA, F. F., CARNEIRO, V. C., FREITAS, G. B., ALVES, L. S., et al. **Oxidative Stress Fuels Trypanosoma Cruzi Infection in Mice.** J. Clin. Invest. 122 (7), 2531–2542, 2012. doi: 10.1172/JCI58525

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease. Risk of exposure to Chagas' disease among seroreactive Brazilian blood donors.** Washington, D.C.: PAHO; 2019. ISBN: 978-92-75-12043-9. Available from: Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chagas Diseases (paho.org).

PENG, D., TARLETON, R., . **EuPaGDT: a web tool tailored to design CRISPR guide RNAs for eukaryotic pathogens.** Microb. genomics 1. 2015 <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000033>

PEREIRA, I.R, VILAR-PEREIRA, G., SILVA, A.A., MOREIRA, O.C., BRITTO, C. SARMENTO, E.D.M. LANNES-VIEIRA, J. **Tumor necrosis factor is a therapeutic target for immunological unbalance and cardiac abnormalities in chronic experimental chagas' heart disease**, Mediators Inflamm. 2014, 798078, 2014 <https://doi.org/10.1155/2014/798078>.

PINAZO MJ, CAÑAS E, ELIZALDE JI, GARCÍA M, GASCÓN J, GIMENO F, GOMEZ J, GUHL F, ORTIZ V, POSADA EDE J, PUENTE S, REZENDE J, SALAS J, SARAVIA J, TORRICO F, TORRUS D, TREVIÑO B. **Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where Trypanosoma cruzi infection is not endemic.** Gastroenterol Hepatol. Mar;33(3):191-200, 2010 doi: 10.1016/j.gastrohep.2009.07.009. Epub 2009 Oct 17. PMID: 19837482.

POINAR, G. **Panstrongylus hispaniolae sp.n (Hemiptera:Reduviidae:Triatominae), a new fossil triatomine in Dominican amber, with evidence of gut flagellates.** Paleodiversity 6, 1–8, 2013.

POINAR G JR. **Triatoma dominicana sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and Trypanosoma antiquus sp. n. (Stercoraria: Trypanosomatidae), the first fossil evidence of a triatomine-trypanosomatid vector association.** Vector Borne Zoonotic Dis. Spring;5(1):72-81, 2005. doi: 10.1089/vbz.2005.5.72. PMID: 15815152.

QIDWAIT T, KHAN MY. **Impact of genetic variations in C-C chemokine receptors and ligands on infectious diseases.** Hum Immunol. 2016 Oct;77(10):961-971. doi: 10.1016/j.humimm.2016.06.010. Epub 2016 Jun 15. PMID: 27316325.

QIN, S., ROTTMAN, J.B., MYERS, P., KASSAM, N., WEINBLATT, M. LOETSCHER, M., KOCH, A.E., MOSER, B, MACKAY, C.R. **The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions,** J. Clin. Investig. 101, 746–754, 1998 <https://doi.org/10.1172/JCI1422>.

RAMÍREZ, J. D., & HERNÁNDEZ, C. (2018). **Trypanosoma cruzi I: Towards the need of genetic subdivision?**, Part II. Em *Acta Tropica* (Vol. 184, p. 53–58). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.05.005>

RAMIREZ, M. I., DE CASSIA RUIZ, R., ARAYA, J. E., DA SILVEIRA, J. F., AND YOSHIDA, N. (1993). Involvement of the Stage-Specific 82-Kilodalton Adhesion Molecule of Trypanosoma Cruzi Metacyclic Trypomastigotes in Host Cell Invasion. *Infect. Immun.* 61 (9), 3636–3641. doi: 10.1128/iai.61.9.3636-3641.1993

RASSI A, MARIN-NETO JA. **Chagas disease.** *Lancet.* 375:1388–402, 2010. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X

RASSI, A., RASSI, A., & MARCONDES DE REZENDE, J. (2012). **American Trypanosomiasis (Chagas Disease).** Em *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 26, Número 2, p. 275–291). <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>

RASSI, A., RASSI, A., & MARIN-NETO, J. A. (2010). **Chagas disease.** *The Lancet,* 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)

REDHEAD, S. A., CUSHION, M. T., FRENKEL, J. K., & STRINGER, J. R.. **Pneumocystis and Trypanosoma cruzi: Nomenclature and Typifications.** *Journal of Eukaryotic Microbiology,* 53(1), 2-11, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00072.x>

REIGNAULT LC, ALCANTARA C DE L, BARRIAS ES, DE SOUZA W. 2019. 3D reconstruction of Trypanosoma cruzi-macrophage interaction shows the recruitment of host cell organelles towards parasitophorous vacuoles during its biogenesis. *J Struct Biol* 205:133–146. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2018.12.010>.

- REQUENA-MÉNDEZ A, ALBAJAR-VIÑAS P, ANGHEBEN A, CHIODINI P, GASCÓN J, MUÑOZ J, Et al. **Health policies to control Chagas disease transmission in European countries.** *PLoS Negl Trop Dis*; 8(10): e3245, 2014.
- RIBEIRO, A. R., LIMA, L., DE ALMEIDA, L. A., MONTEIRO, J., MORENO, C. J. G., NASCIMENTO, J. D., DE ARAÚJO, R. F., MELLO, F., MARTINS, L. P. A., GRAMINHA, M. A. S., TEIXEIRA, M. M. G., SILVA, M. S., STEINDEL, M., & DA ROSA, J. A. (2018). **Biological and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from four states of Brazil.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(2), 453–463. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0200>
- RICHLE R. Chemotherapy of experimental acute Chagas disease in mice: beneficial effect of Ro-71051 on parasitemia and tissue parasitism. *Le Progres Medical* 101: 282, 1973
- RISSO, M. G., GARBARINO, G. B., MOCETTI, E., CAMPETELLA, O., CAPPÀ, S. M. G., BUSCAGLIA, C. A., ET AL. (2004). Differential Expression of a Virulence Factor, the Trans-Sialidase, by the Main *Trypanosoma Cruzi* Phylogenetic Lineages. *J. Infect. Dis.* 189 (12), 2250–2259. doi: 10.1086/420831
- RODRIGUES COURA/ +, J., & DE CASTRO, S. L. (2002). **A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy.** *Em Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* (Vol. 97, Número 1).
- RODRIGUES, A. A., CLEMENTE, T. M., DOS SANTOS, M. A., MACHADO, F. C., GOMES, R. G. B., MOREIRA, H. H. T., CRUZ, M. C., BRÍGIDO, P. C., DOS SANTOS, P. C. F., MARTINS, F. A., BAHIA, D., MARICATO, J. T., JANINI, L. M. R., REBOREDO, E. H., MORTARA, R. A., & DA SILVA, C. V. (2012a). **A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis.** *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051384>
- RODRIGUES, A. A., CLEMENTE, T. M., DOS SANTOS, M. A., MACHADO, F. C., GOMES, R. G. B., MOREIRA, H. H. T., et al. **A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma* P21 Enhances Phagocytosis.** *PLoS One* 7 (12), 1–9, 2012a. doi: 10.1371/journal.pone.0051384
- RODRIGUES, A. A., SAOSA, J. S. S., DA SILVA, G. K., MARTINS, F. A., DA SILVA, A. A., DA SILVA SOUZA NETO, C. P., HORTA, C. V., ZAMBONI, D. S., DA SILVA, J. S., FERRO, E. A. V., & DA SILVA, C. V. (2012b). **IFN- γ plays a unique role in protection against low virulent *Trypanosoma cruzi* strain.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001598>
- RODRIGUES, J. P. F., SANTANA, G. H. T., JULIANO, M. A., AND YOSHIDA, N. (2017). **Inhibition of Host Cell Lysosome Spreading by *Trypanosoma Cruzi* Metacyclic Stage-Specific Surface Molecule Gp90 Downregulates Parasite Invasion.** *Infect. Immun.* 85 (9), 1–10. doi: 10.1128/IAI.00302-17
- RODRIGUES, M.M., OLIVEIRA, A.C., BELLIO, M. **The immune response to *Trypanosoma cruzi*: role of toll-like receptors and perspectives for vaccine development,** *J. Parasitol. Res* 2012, 507874, 2012 <https://doi.org/10.1155/2012/507874>.
- ROGERLÂNDIO MARTINS-MELO, F., RAMOS, A. N., ALENCAR, C. H., & HEUKELBACH, J. (2014). **Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis.** *Acta Tropica*, 130, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.10.002>

ROMANO, P. S., ARBOIT, M. A., VÁZQUEZ, C. L., AND COLOMBO, M. I. **The Autophagic Pathway Is a Key Component in the Lysosomal Dependent Entry of Trypanosoma Cruzi into the Host Cell.** *Autophagy* 5 (1), 6–18, 2009. doi: 10.4161/ROPERT, C., GAZZINELLI, R.T. **Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa,** *Curr. Opin. Microbiol.* 3 () 395–403, 2000 <https://doi.org/>

RUIZ, R. C., FAVORETO, S., DORTA, M. L., OSHIRO, M. E. M., FERREIRA, A. T., MANQUE, P. M., et al. (1998). **Infectivity of Trypanosoma Cruzi Strains Is Associated with Differential Expression of Surface Glycoproteins with Differential Ca²⁺ Signalling Activity.** *Biochem. J.* 330 (1), 505–511. doi: 10.1042/bj3300505

SALASSA, B. N., AND ROMANO, P. S. **Autophagy: A Necessary Process during the Trypanosoma Cruzi Life-Cycle.** *Virulence* 10 (1), 460–469, 2019. doi: 10.1080/21505594.2018.1543517

SALASSA, B. N., CUETO, J. A., TUDELA, J.G., AND ROMANO, P. S. **Endocytic Rabs Are Recruited to the Trypanosoma Cruzi Parasitophorous Vacuole and Contribute to the Process of Infection in Non-Professional Phagocytic Cells.** *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 2020.536985 (October), 2020. doi: 10.3389/fcimb.2020.536985

SAN FRANCISCO, J., BARRÍA, I., GUTIÉRREZ, B., NEIRA, I., MUÑOZ, C., SAGUA, H., et al. (2017). **Decreased Cruzipain and Gp85/Trans-Sialidase Family Protein Expression Contributes to Loss of Trypanosoma Cruzi Trypomastigote Virulence.** *Microbes Infect.* 19 (1), 55–61. doi: 10.1016/j.micinf.2016.08.003

SÁNCHEZ-VALDÉZ, F. J., PADILLA, A., WANG, W., ORR, D., & TARLETON, R. L. (2018). **Spontaneous dormancy protects trypanosoma cruzi during extended drug exposure.** *eLife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.34039>

SCHARFSTEIN, J., SCHMITZ, V., MORANDI, V., CAPELLA, M. M. A., LIMA, A. P. C. A., MORROT, A., ET AL. (2000). **Host Cell Invasion by Trypanosoma Cruzi Is Potentiated by Activation of Bradykinin B2 Receptors.** *J. Exp. Med.* 192, 1289–1300. doi: 10.1084/jem.192.9.1289

SCHAUB, G. A. (1988). **Developmental time and mortality of larvae of Triatoma infestans infected with Trypanosoma cruzi.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(1), 94–96. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(88\)90273-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(88)90273-8)

SCHENKMAN, S., JIANG, M. S., HART, G. W., AND NUSSENZWEIG, V. (1991). **A Novel Cell Surface Trans-Sialidase of Trypanosoma Cruzi Generates a Stage-Specific Epitope Required for Invasion of Mammalian Cells.** *Cell* 65, 1117–1125. doi: 10.1016/0092-8674(91)90008-M

SEN, R., NAYAK, L., & DE, R. K. (2016). **A review on host–pathogen interactions: classification and prediction.** Em *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (Vol. 35, Número 10, p. 1581–1599). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2716-7>

SERA NK, FUKUHARA K, MYIATA N, ET al. **Mutagenicity of nitro-azobenzene [a]pyren and its related compounds.** *Mutat Res* ;280:81–5, 1982

SHAW J, LAINSON R, FRAIHA H. **Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil.** *Rev Saude Publica.* (1969) 3:153–7. doi: 10.1590/s0034-89101969000200005

SHIKANAI YASUDA, M. A. (2021). **Emerging and reemerging forms of trypanosoma cruzi transmission.** Em *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* (Vol. 116, Número 1). Fundacao Oswaldo Cruz. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210033>

- SHIKANAI-YASUDA, MA, CARVALHONB. **Oral transmission of chagas disease.** *Clin Infect Dis.* (2012) 54:845–52. doi: 10.1093/cid/cir956
- SICA, R. E., GONZALEZ CAPPA, S. M., SANZ, O. P., & MIRKIN, G. (1995). **Peripheral nervous system involvement in human and experimental chronic American trypanosomiasis.** *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique (1990)*, 88(4), 156–163. <https://europepmc.org/article/MED/8640077>
- SILVA NN, CLAUSELL DT, NÚBILOS H, MELLO AL, OSSANAI J, RAPONE T, et al. **Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral.** *Rev Inst Med Trop.* (1968) 10:265–76.
- SILVA, T. R. M., BARROS, G. M. M. D. R., LIMA, T. A. R. F., GIANNELLI, A., SILVA, G. M. DA, ALVES, K. M. DE L., DE CARVALHO, G. A., & RAMOS, R. A. N. (2019). **Spatial distribution of triatomine bugs in a chagas disease endemic region in Brazil.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 52. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0278-2019>
- SNODGRASS, W. R. (2010). **Diagnosis and Treatment of Poisoning Due to Pesticides.** *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, Third Edition: Volume 1, 1*, 1295–1311. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00060-4>
- SOSA-ESTANI S. **Epidemiología de la enfermedad de Chagas en los países endémicos.** In: Viotti RJ, Vigliano CA, editors. *Enfermedad de Chagas: un enfoque práctico basado en la investigación médica.* Buenos Aires, Argentina: Editorial Panamericana; 2014. p. 45–56.
- SOUSA, G., GOMES, J.A.S., FARES, R.C.G., DAMÁSIO, M.P.D.S., CHAVES, A.T. K. S. FERREIRA, M.C.P. NUNES, N.I. MEDEIROS, V.A.A. VALENTE, R. CORRÊA-OLIVEIRA, M.O. D.C. ROCHA, **Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease,** *PLoS One* 9, 1–9, 2014 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087082>.
- SOUZA, P.E.A., ROCHA, M.O.C., MENEZES, C.A.S., COELHO, J.S., CHAVES, SOUZA, P.E.A., ROCHA, M.O.C., MENEZES, C.A.S., COELHO, J.S., CHAVES, A.C.L. GOLLOB, K. J., DUTRA, W.O. **Trypanosoma cruzi infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease,** *Infect. Immun.* 75, 1886–1894, 2007 <https://doi.org/10.1128/IAI.01931-06>.
- SOUZA, P.E.A., ROCHA, M.O.C., ROCHA-VIEIRA, E., MENEZES, C.A.S., CHAVES, A.C.L., GOLLOB, K. J. DUTRA, W.O. **Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity,** *Infect. Immun.* 72, 5283–5291, 2004 <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5283-5291.2004>.
- STADELMANN B, LIN LK, KUNZ TH, RUEDI M: **Molecular phylogeny of new world Myotis (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes.** *Mol Phylogenet Evol* 2007, 43:32–48.
- STADELMANN, B., LIN, L. K., KUNZ, T. H., & RUEDI, M. (2007). **Molecular phylogeny of New World Myotis (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from**

mitochondrial and nuclear DNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(1), 32–48. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.06.019>

STEVENS JR, NOYES HA, DOVER GA, GIBSON WC. **The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*.** *Parasitology* 1999;118(1):107-16.

STEVEDING, D. (2014). **The history of Chagas disease.** *Parasites and Vectors*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-317/FIGURES/4>

SUÁREZ, C., NOLDER, D., GARCÍA-MINGO, A., MOORE, D. A., & CHIODINI, P. L. (2022). **Diagnosis and Clinical Management of Chagas Disease: An Increasing Challenge in Non-Endemic Areas.** *Research and Reports in Tropical Medicine, Volume 13*, 25–40. <https://doi.org/10.2147/rrtm.s278135>

SUGITA, S., HAN, W., BUTZ, S., LIU, X., FERNÁNDEZ-CHACÓN, R., LAO, Y., et al. **Synaptotagmin VII as a Plasma Membrane Ca²⁺ Sensor in Exocytosis.** *Neuron* 30, 459–473. doi: 10.1016/S0896-6273(01)00290-2

TAKAGI, Y., SATO, M., NAYA, M., & SATO, C. (2022). Differentiating *Trypanosoma cruzi* in a Host Mammalian Cell Imaged in Aqueous Liquid by Atmospheric Scanning Electron Microscopy. <https://journals.asm.org/journal/spectrum>

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

TAYLOR, M. C., LANDER, N., & YOSHIDA, N. (2020). **Editorial: Unravelling *T. cruzi* Biology.** *Em Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00382>

TAYLOR, M. C., WARD, A., OLMO, F., JAYAWARDHANA, S., FRANCISCO, A. F., LEWIS, M. D., & KELLY, J. M. (2020). **Intracellular dna replication and differentiation of *trypanosoma cruzi* is asynchronous within individual host cells in vivo at all stages of infection.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008007>

TEIXEIRA, A. A. R., DE CÁSSIA SARDINHA DE VASCONCELOS, V., COLLI, W., ALVES, M. J. M., AND GIORDANO, R. J. (2015). ***Trypanosoma Cruzi* Binds to Cytokeratin through Conserved Peptide Motifs Found in the Laminin-G-Like Domain of the Gp85/ Trans-Sialidase Proteins.** *PLoS Neglect. Trop. Dis.* 9 (9), e0004099. doi: 10.1371/ Journal.pntd.0004099

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

TEIXEIRA, S. M. R., RUSSELL, D. G., KIRCHHOFF, L. V., AND DONELSON, J. E. **A Differentially Expressed Gene Family Encoding ‘amastin,’ a Surface Protein of *Trypanosoma Cruzi* Amastigotes.** *J. Biol. Chem.* 269 (32), 20509–20516, 1994.

TEIXEIRA, T. L., CASTILHOS, P., RODRIGUES, C. C., DA SILVA, A. A., BRÍGIDO, R. T., TEIXEIRA, S. C., BORGES, B. C., DOS SANTOS, M. A., MARTINS, F. A., SANTOS, P. C. F., SERVATO, J. P. S., SILVA, M. S., DA SILVA, M. J. B., ELIAS, M.

- C., & DA SILVA, C. V. (2019). **Experimental evidences that P21 protein controls Trypanosoma cruzi replication and modulates the pathogenesis of infection.** *Microbial Pathogenesis*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103618>
- TEIXEIRA, T. L., CHIURILLO, M. A., LANDER, N., RODRIGUES, C. C., ONOFRE, T. S., FERREIRA, É. R., YONAMINE, C. M., SANTOS, J. DE G., MORTARA, R. A., DA SILVA, C. V., & SILVEIRA, J. F. DA. (2022). **Ablation of the P21 Gene of Trypanosoma cruzi Provides Evidence of P21 as a Mediator in the Control of Epimastigote and Intracellular Amastigote Replication.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.799668>
- TEIXEIRA, T. L., CRUZ, L., MORTARA, R. A., & DA SILVA, C. V. (2015). **Revealing Annexin A2 and ARF-6 enrollment during Trypanosoma cruzi extracellular amastigote-host cell interaction.** *Parasites and Vectors*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1097-6>
- TIBAYRENC M, AYALA FJ. **Isozyme variability in trypanosoma cruzi, the agent of chagas' disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance.** *Evolution*. ;42(2):277-292.Mar,1988 doi: 10.1111/j.1558-5646.1988.tb04132.x. PMID: 28567853.
- TIBAYRENC, M. (1998). **Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach.** Em *International Journal for Parasitology* (Vol. 28).
- TONELLI, R. R., GIORDANO, R. J., BARBU, E. M., TORRECILHAS, A. C., KOBAYASHI, G. S., LANGLEY, R. R., et al. (2010). **Role of the Gp85/Trans-Sialidases in Trypanosoma Cruzi Tissue Tropism: Preferential Binding of a Conserved Peptide Motif to the Vasculature in Vivo.** *PLoS Neglect. Trop. Dis.* 4 (11), e864. doi: 10.1371/Journal.pntd.0000864
- TORRICO F. **Chagas congénito.** In: Viotti RJ, Vigliano CA, editors. **Enfermedad de Chagas: un enfoque práctico basado en la investigación médica.** Buenos Aires, Argentina: Editorial Panamericana; 2014. p. 117–28.
- TORZEWSKI, M., WENZEL, P., KLEINERT, H. C. BECKER, J. EL-MASRI, E. WIESE, M. BRANDT, A. PAUTZ, L. TWARDOWSKI, E. SCHMITT, T. MÜNZEL, K. REIFENBERG, **Chronic inflammatory cardiomyopathy of interferon γ overexpressing transgenic mice is mediated by tumor necrosis factor- α ,** *Am. J. Pathol.* 180 73–81, 2012 <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.09.006>.
- TYLER, K. M., & ENGMAN, D. M. ([s.d.]). *The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited.* www.parasitology-online.com
- VAGO, A. R., ANDRADE, L. O., LEITE, A. A., D'ÁVILA REIS, D., MACEDO, A. M., ADAD, S. J., TOSTES, S., MOREIRA, M. DA C. V., FILHO, G. B., & PENA, S. D. J. (2000). **Genetic characterization of Trypanosoma cruzi directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs.** *The American Journal of Pathology*, 156(5), 1805–1809. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65052-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65052-3)
- VELÁSQUEZ-ORTIZ, N., HERRERA, G., HERNÁNDEZ, C., MUÑOZ, M., & RAMÍREZ, J. D. (2022). **Discrete typing units of Trypanosoma cruzi: Geographical and biological distribution in the Americas.** *Scientific Data*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01452-w>

WANG, T., LI, L., AND HONG, W. **SNARE Proteins in Membrane Trafficking.** *Traffic* 18, 767–775, 2017. doi: 10.1111/tra.12524

WATANABE COSTA, R., DA SILVEIRA, J. F., AND BAHIA, D. **Interactions between Trypanosoma Cruzi Secreted Proteins and Host Cell Signaling Pathways.** *Front. Microbiol.* 7:2016.00388 (MAR), 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.00388

WILKINSON, S.R. TAYLOR, M.C. HORN, D. KELLY, J.M. CHEESEMAN, I. **A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (13) 5022–5027, 2008.

WOOLSEY, A. M., SUNWOO, L., PETERSEN, C. A., BRACHMANN, S. M., CANTLEY, L. C., AND BURLEIGH, B. A. **Novel PI 3-Kinase-Dependent Mechanisms of Trypanosome Invasion and Vacuole Maturation.** *J. Cell Sci.* 116 (17), 3611– 3622, 2003. doi: 10.1242/jcs.00666

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates.** *Wkly Epidemiol Rec.* (2015) 90:33 44. Available online at: <https://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf?ua=1>

WYATT, P.G., GILBERT, I.H., READ, K.D., FAIRLAMB, A.H. **Target validation: linking target and chemical properties to desired product profile,** *Curr. Top. Med. Chem.* 11 (10) (2011) 1275–1283, <https://doi.org/10.2174/156802611795429185>.

YOSHIDA, N., DORTA, M. L., FERREIRA, A. T., OSHIRO, M. E. M., MORTARA, R. A., ACOSTA- SERRANO, A., et al. (1997). **Removal of Sialic Acid from Mucin-like Surface Molecules of Trypanosoma Cruzi Metacyclic Trypomastigotes Enhances Parasite-Host Cell Interaction.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 84 (1), 57–67. doi: 10.1016/S0166-6851(96)02783-1

YOSHIDA, N., FAVORETO, S., FERREIRA, A. T., AND MANQUE, P. M. (2000). **Signal Transduction Induced in Trypanosoma Cruzi Metacyclic Trypomastigotes during the Invasion of Mammalian Cells.** *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 269– 278. doi: 10.1590/S0100-879X2000000300003

ZAFRA G, MANTILLA JC, VALADARES HM, MACEDO AM, GONZÁLEZ CI. **Evidence of Trypanosoma cruzi II infection in Colombian chagasic patients.** *Parasitol Res.* ;103:731–734, 2008.

ZANFORLIN, T., BAYER-SANTOS, E., CORTEZ, C., ALMEIDA, I. C., YOSHIDA, N., AND SILVEIRA, J. F. DA. (2013). **Molecular Characterization of Trypanosoma Cruzi SAP Proteins with Host-Cell Lysosome Exocytosis-Inducing Activity Required for Parasite Invasion.** *PLoS One* 8 (12), e83864. doi: 10.1371/journal.pone.0083864

ZINGALES, B. (2018). **Trypanosoma cruzi genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity.** *Em Acta Tropica* (Vol. 184, p. 38–52). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>

ZINGALES, B., & BARTHOLOMEU, D. C. (2021). **Trypanosoma cruzi genetic diversity: Impact on transmission cycles and chagas disease.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 116(1). <https://doi.org/10.1590/0074-02760210193>

ZINGALES, B., MILES, M. A., CAMPBELL, D. A., TIBAYRENC, M., MACEDO, A. M., TEIXEIRA, M. M. G., SCHIJMAN, A. G., LLEWELLYN, M. S., LAGES-SILVA, E., MACHADO, C. R., ANDRADE, S. G., & STURM, N. R. (2012). **The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications.** *Em Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 12, Número 2, p. 240–253). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>

ZINGALES, B., MILES, M. A., CAMPBELL, D. A., TIBAYRENC, M., MACEDO, A. M., TEIXEIRA, M. M. G., SCHIJMAN, A. G., LLEWELLYN, M. S., LAGES-SILVA, E., MACHADO, C. R., ANDRADE, S. G., & STURM, N. R. (2012). **The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications.** Em *Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 12, Número 2, p. 240–253). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>

8. ANEXOS

Anexo I. Uso de animais modificados geneticamente

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO - Seção 1

ISSN 1677-7042

Nº 94, quinta-feira, 18 de maio de 2023

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

GABINETE DA MINISTRA

PORTARIA MCTI Nº 7.020, DE 17 DE MAIO DE 2023

Realoca Funções Comissionadas Executivas - FCE dentro do Quadro Demonstrativo de Cargos em Comissão e de Funções de Confiança do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

A MINISTRA DE ESTADO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO, no uso das atribuições que lhe confere o art. 87, Parágrafo Único, inciso II, da Constituição Federal, e tendo em vista o disposto no art. 5º do Decreto nº 11.493, de 17 de abril de 2023, e no art. 13 do Decreto nº 10.829, de 5 de outubro de 2021, resolve:

Art. 1º Fica realocado dentro do quadro demonstrativo de cargos em comissão e de funções de confiança do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação:

I - uma Função Comissionada Executiva - FCE 1.10, da Coordenação-Geral de Orçamento e Finanças da Subsecretaria de Orçamento, Administração e Planejamento para a Coordenação-Geral de Estratégia e Governança do Departamento de Governança e Indicadores de Ciência e Tecnologia, ambos da Secretaria Executiva;

II - uma Função Comissionada Executiva - FCE 2.05, da Coordenação de Planejamento, da Coordenação-Geral de Orçamento e Finanças da Subsecretaria de Orçamento, Administração e Planejamento para a Coordenação de Planejamento, da Coordenação-Geral de Estratégia e Governança do Departamento de Governança e Indicadores de Ciência e Tecnologia, ambos da Secretaria Executiva;

III - uma Função Comissionada Executiva - FCE 2.02, da Coordenação de Planejamento, da Coordenação-Geral de Orçamento e Finanças da Subsecretaria de Orçamento, Administração e Planejamento para a Coordenação de Planejamento, da Coordenação-Geral de Estratégia e Governança do Departamento de Governança e Indicadores de Ciência e Tecnologia, ambos da Secretaria Executiva.

Art. 2º Esta Portaria entra em vigor em 26 de maio de 2023.

LUCIANA SANTOS

DIDEP	Divisão de Desenvolvimento de Pessoas	1	Chefe de Divisão	FCE 1.07
DIDEP		2	Assistente Técnico	FCE 2.02
(.....)				

(.....)

ANEXO XIII CARGOS EM COMISSÃO E FUNÇÕES DE CONFIANÇA DA SECRETARIA DE DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E INOVAÇÃO

UNIDADE	CARGO/FUNÇÃO Nº	DENOMINAÇÃO CARGO/FUNÇÃO	CCE/FCE
(.....)			
DEPARTAMENTO DE APOIO AOS ECOSISTEMAS DE INOVAÇÃO	1	Diretor	CCE 1.15
Coordenação-Geral de Ambientes Inovadores e Startups	1	Coordenador-Geral	CCE 1.13
Coordenação de Ambientes Inovadores e Startups	1	Coordenador	FCE 1.10

....." (NR)

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 8.488/2023

A Presidência da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 261ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 11/05/2023, a Comissão apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Informação e decisão.

A CTNBio esclarece que este extrato não exige a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis ao objeto do requerimento.

A íntegra deste Parecer Técnico consta do processo arquivado na CTNBio. Informações complementares ou solicitações de maiores informações sobre o processo, deverão ser encaminhadas, via Sistema FÁLABR, através da página eletrônica do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 8.494/2023

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 261ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 11/05/2023, a Comissão apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo SEI nº: 01245.004499/2023-19
Requerente: CJ do Brasil Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios Ltda.

CQB: 332/11
Endereço: Rodovia Piracicaba São Pedro KM 10, Distrito Industrial Noroeste, Zona Rural. CEP: 13405-971 - Cx. Postal: 1218 - Piracicaba/SP.

Assunto: Solicitação de parecer extensão de Certificado de Qualidade de Biossegurança da instituição para inclusão de atividades de áreas com nível de biossegurança NB1

Extrato Prévio: 8781/2023, publicado no Diário Oficial da União em 22/03/2023

Decisão: DEFERIDO
O Presidente da Comissão Interna de Biossegurança da CJ do Brasil Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios Ltda., Dr. Paulo Henrique de Agostino Paschoalino, solicita parecer para extensão de Certificado de Qualidade de Biossegurança da instituição

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO
Presidente da Comissão

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 8.499/2023

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 261ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 11/05/2023, a Comissão apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo SEI nº: 01245.004217/2023-83
Requerente: Universidade Federal de Uberlândia.
Endereço: Rua Ceará 1111 - 1201, Umuarama, Uberlândia - MG, CEP 38405-315.
CQB: 163/02

Assunto: Solicitação de parecer para execução de atividade de pesquisa com Organismo Geneticamente Modificado - OGM da classe de risco 2 em áreas com nível de biossegurança NB-2.

Extrato Prévio: 8739/2023, publicado no Diário Oficial da União em 24/02/2023

Decisão: DEFERIDO
A Presidente da Comissão Interna de Biossegurança da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Dra. Karinne Spirandelli Carvalho Naves, solicita parecer técnico da CTNBio para execução de projeto de pesquisa com Organismo Geneticamente Modificado, denominado "Ensaio celular para avaliação funcional de anticorpos anti-PD1", a ser desenvolvido nas instalações da Rede de Biotérios de Roedores - REBIR da instituição, sob a responsabilidade do Dr. Claudio Vieira da Silva. No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a Comissão concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

A CTNBio esclarece que este extrato não exige a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis ao objeto do requerimento.



Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico <http://www.in.gov.br/autenticidade.html>, pelo código 05152023051800005

5

Documento assinado digitalmente conforme MP nº 2.200-2 de 24/08/2001, que institui a Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileira - ICP-Brasil.



Anexo II. Certificado da CEUA para o uso de animais de laboratório



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação
Rede de Biotérios de Roedores da UFU
Biotério Central



Uberlândia, 19 de outubro de 2022

Ao Senhor Coordenador da Comissão de Ética na Utilização de Animais
Campus Umuarama Uberlândia - MG

ASSUNTO: Anuência para utilização da REBIR-UFU

Por meio deste, o Biotério Central da Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia confere anuência, mediante análise da demanda geral de usuários do Biotério Central, ao projeto de pesquisa intitulado: “O papel da P21 de *Trypanosoma cruzi* na infecção experimental *in vivo*”, sob coordenação do (a) **Prof (a). Dr (a). Claudio Vieira da Silva**, a ser executado no período de 15/01/2023 à 14/01/2025. Tal anuência se dá em relação à:

Espaço Físico para desenvolvimento dos experimentos: Sim (X) Não ():

OBS 1: Ressalta-se que tais experimentos somente serão realizados nas dependências físicas da REBIR após aprovação pela CEUA;

OBS 2: Para realização de solicitação de animais ao Biotério Central da REBIR é necessário anexar o Certificado de Aprovação ao formulário de solicitação na página da REBIR.

Animais: Sim (X) Não ():

Linhagem/Colônia	BALB/c	IFN-g-/-		
Idade	5-6 semanas	5-6 semanas		
Peso aproximado	15-20g	15-20g		
Sexo	Macho (15); Fêmea (--); Subtotal: 15	Macho (15); Fêmea (--); Subtotal: 15		
Total	30			

Atenciosamente,


Loyane Bertagnolli Coutinho
Coordenadora Área Experimentação REBIR-UFU
Portaria PROPP Nº 13 de 06.06.2018