

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**O papel da calcineurina humana na modulação da infecção por
*Trypanossoma cruzi***

Laura Eduarda Miranda da Silva

Uberlândia-MG

Maio/2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

O papel da calcineurina humana na modulação da infecção por
Trypanossoma cruzi

Projeto de pesquisa submetido ao Prof.
Dr. Claudio Vieira da Silva como
requisito parcial para obtenção de nota.

Documento assinado digitalmente
gov.br LAURA EDUARDA MIRANDA DA SILVA
Data: 22/09/2025 11:58:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Laura Eduarda Miranda da Silva
Documento assinado digitalmente

gov.br CLAUDIO VIEIRA DA SILVA
Data: 23/09/2025 12:40:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva (Orientador)

Documento assinado digitalmente
gov.br CECILIA LUIZA PEREIRA
Data: 23/09/2025 12:11:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Me. Cecília Luiza Pereira (Co-orientadora)

Uberlândia-MG
Maio/2025

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho é resultado de um esforço coletivo e de uma jornada que não percorri sozinha. Por isso, expresso minha profunda gratidão a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a sua conclusão.

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder a força, a sabedoria e amor para a realização deste sonho, acompanhando-me em toda a minha jornada acadêmica, sem Ele nada é possível.

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva, pela oportunidade de aprendizado e pelo projeto que propôs, um verdadeiro avanço para a ciência e a saúde global. Agradeço profundamente à minha coorientadora, M.^as Cecília Luiza Pereira, por me acompanhar durante todo o desenvolvimento da pesquisa, por sua paciência, dedicação e pelo aprendizado que me proporcionou. Sua amizade e orientação foram inestimáveis.

Aos meus pais, que foram meu pilar e me deram apoio incondicional em toda a jornada. Devo a eles esta conquista, que também é deles. Minha eterna gratidão por sempre me incentivarem e por serem minhas maiores inspirações de vida e força. Ao meu irmão, que me apoiou e me alegrou em toda a caminhada, inspirando-me a ser um exemplo para ele.

Ao meu amado namorado, que foi meu porto seguro e fonte de força em todos os momentos. Sua mão segurou a minha em cada desafio, seu incentivo foi a razão para eu não desistir. Esta conquista também é nossa.

Agradeço a todos os professores do curso de Biotecnologia, que com seus ensinamentos, me inspiraram e me formaram como profissional.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo fomento à pesquisa e por fornecerem toda a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos os amigos que fizeram parte desta jornada, com quem compartilhei desafios, superações e construí memórias.

RESUMO

A Doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, continua sendo um grave problema de saúde pública. A calcineurina humana, uma proteína reguladora dependente de cálcio, desempenha papéis cruciais em processos celulares e imunológicos, mas sua participação na infecção por *T. cruzi* ainda é pouco explorada. Neste trabalho, avaliou-se o efeito da inibição da calcineurina A por ciclosporina A (CsA) em macrófagos RAW 264.7 infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Foram realizados ensaios de viabilidade celular e parasitária, invasão e multiplicação intracelular, além da dosagem de óxido nítrico e citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12). Os resultados demonstraram que a CsA reduziu a capacidade de invasão e replicação do parasita, além de modular a resposta inflamatória por meio da diminuição de IL-1 β , IL-12, IL-6 e aumento relativo de IL-10. Esses achados sugerem que a calcineurina exerce papel relevante na interação hospedeiro-parasita e pode ser alvo promissor para estratégias terapêuticas contra a Doença de Chagas.

Palavras-chave: Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; calcineurina; ciclosporina A; citocinas; macrófagos.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, remains a major public health concern. Human calcineurin, a calcium-dependent regulatory protein, plays critical roles in cellular and immune processes, but its involvement in *T. cruzi* infection is still poorly understood. In this study, the effect of calcineurin A inhibition by cyclosporin A (CsA) was evaluated in RAW 264.7 macrophages infected with the Y strain of *T. cruzi*. Cell and parasite viability assays, invasion and intracellular multiplication tests, as well as nitric oxide and cytokine quantification (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12) were performed. Results showed that CsA reduced parasite invasion and replication and modulated the inflammatory response by decreasing IL-1 β , IL-12, IL-6 while relatively increasing IL-10. These findings suggest that calcineurin plays a relevant role in host-parasite interaction and may represent a promising therapeutic target against Chagas disease.

Keywords: Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; calcineurin; cyclosporin A; cytokines; macrophages.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor que
\leq	Menor ou igual a
=	Igual
>	Maior que
°C	Graus Celsius
β	Beta
$\mu\text{g}/\text{ml}$	Micrograma por mililitro
h	Horas
hpi	Horas pós-infecção (hours post-infection)
cAMP	AMP cíclico; Adenosina monofosfato cíclico
Calcineurina A	Subunidade catalítica da calcineurina
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo infectado
CN	Calcineurina Humana
Complexo G- $\beta\gamma$	Subunidades β e γ da proteína G
CO ₂	Dióxido de carbono
CsA	Ciclosporina A
CTRL	Controle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTUs	Discrete Typing Units, unidades discretas de tipagem
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FOXO	Proteínas FOXO
IFN- γ	Interferon gama
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina

iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
kDNA	DNA do cinetoplasto
LLC-MK2	Linhagem celular derivada de rim de macaco rhesus
MEF2	Fator de potencialização de miócitos 2
mg/L	Miligramma por litro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicity of Infection, multiplicidade de infecção
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NF-κB	Fator nuclear kappa B
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline, solução tampão salina fosfatada
PPP3CA	Gene codificador da subunidade catalítica alfa da proteína
fosfatase 2B (calcineurina A)	
PRÉ	Pré-tratamento com CsA 1hora antes da infecção
PRÉ+TRAT	Tratamento contínuo após a infecção
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute Medium
SFB	Soro fetal bovino
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
TFEB	Fator de transcrição EB
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAT	Tratamento com CsA após a infecção
USA	Estados Unidos da América
VP	Vacúolo parasitóforo
WTY	Cepa selvagem Y de <i>T. cruzi</i> (wild type)

Índice de Figuras

Figura 1- Formas evolutivas do <i>Trypanossoma cruzi</i>. (a) Amastigotas: Forma evolutiva arredondada, encontrada em tecidos do hospedeiro vertebrado. (b) Epimastigotas: forma replicativa e flagelada, encontrada no trato digestivo do inseto vetor. (c) Tripomastigotas: formas flageladas não replicativas, encontradas no final do sistema digestivo do vetor, e no sangue e espaço intercelular do hospedeiro vertebrado (Peña-Callejas et al., 2022).....	3
Figura 2- Principais espécies de triatomíneos que atuam como vetores do <i>T. cruzi</i>. Fonte: (Rassi & Marin-Neto, 2010)	5
Figura 3- Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> . Fonte: Centro de Controle de Doenças e Prevenção, USA.....	7
Figura 4- Avaliação da toxicidade da ciclosporina A sobre tripomastigotas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição. Os parasitas foram tratados com diferentes concentrações da droga (10 µg/mL, 7,5 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL e 1 µg/mL), sendo DMSO e controle sem tratamento (CTRL) utilizados como referência. A toxicidade foi expressa em porcentagem de células viáveis nos tempos de 24h, 48h e 72h, e 96h. Resultados representam média ± erro padrão. Diferenças estatísticas significativas foram indicadas com os respectivos valores de p (ANOVA seguida de teste de Tukey)	18
Figura 5- Viabilidade das células RAW 264.7 tratadas com ciclosporina A nas concentrações de 10 µg/mL, 7,5 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL e 1 µg/mL, avaliada após 24, 48, 72 e 96 horas. Os grupos controle (CTRL) e DMSO foram incluídos como comparativos. A viabilidade foi expressa em percentual de células vivas. Resultados apresentados como média ± erro padrão, com indicação dos valores de p para comparações estatísticas significativas (ANOVA seguida de teste de Tukey)	19
Figura 6- Avaliação da invasão de <i>T. cruzi</i> cepa Y em células RAW 264.7 sob diferentes condições de tratamento com ciclosporina A. O gráfico apresenta o número médio de células infectadas por 100 células analisadas. As condições experimentais foram: controle (CTRL, sem tratamento), pré-tratamento com ciclosporina A (PRÉ), pré-tratamento seguido de tratamento contínuo (PRÉ+TRAT) e tratamento apenas após a infecção (TRAT). Observa-se redução significativa no número de células infectadas nos grupos PRÉ ($p = 0,001$) e PRÉ+TRAT ($p = 0,0007$), quando comparados ao grupo controle. Dados expressos como média ± DP	20
Figura 7- Cinética de infecção intracelular por <i>T. cruzi</i> cepa Y em células RAW 264.7 tratadas ou não com ciclosporina A. Distribuição do número de células infectadas por 100 células analisadas, de acordo com a carga parasitária intracelular (1, 2–5, 6–10 e >10 parasitas) nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas pós-infecção (hpi). Os grupos controle (preto) e tratado com	

ciclosporina A (cinza claro) foram comparados por análise estatística. Dados expressos como média ± DP	21
Figura 8- Número médio de parasitas intracelulares por 100 células infectadas em diferentes tempos pós-infecção com <i>T. cruzi</i> cepa Y. Gráfico de barras representando a média de parasitas intracelulares por 100 células infectadas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas pós-infecção. Comparação entre grupo controle (preto) e grupo tratado com ciclosporina A (cinza claro). Dados expressos como média ± DP	22
Figura 9- Produção de óxido nítrico (NO) por células RAW 264.7 infectadas com <i>T. cruzi</i> cepa Y e submetidas a diferentes condições de tratamento com ciclosporina A. Concentração de NO (μ M) medida por reação de Griess nos tempos de 24 h, 48 h, 72 h e 96 h pós-infecção. Foram avaliados os seguintes grupos: controle negativo (C-), controle positivo infectado (C+), pré-tratamento com ciclosporina A (PRÉ) e tratamento após infecção (TRAT). Dados expressos como média ± DP.....	23
Figura 10- Produção de IL-1 β por macrófagos RAW 264.7 infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com ciclosporina A. (A) Concentração de IL-1 β em sobrenadantes de culturas de macrófagos em 24 horas pós-infecção (hpi), nas condições: Controle (células não tratadas), Pré-tratamento (ciclosporina A administrada 1h antes da infecção), e Tratamento (ciclosporina A administrada após a infecção). (B) Concentração de IL-1 β aos 96 hpi nas mesmas condições experimentais. (C) Comparação temporal entre 24 e 96 hpi para cada condição experimental. As dosagens foram realizadas por ELISA. Resultados apresentados como média ± desvio padrão; p < 0.05	24
Figura 11- Avaliação da produção de IL-6 em macrófagos RAW 264.7 infectados por <i>T. cruzi</i> e submetidos à modulação com ciclosporina A. (A) Níveis de IL-6 aos 24 hpi nas condições de Controle, Pré-tratamento e Tratamento com ciclosporina A. (B) Níveis de IL-6 aos 96 hpi. (C) Análise comparativa da produção de IL-6 entre 24 e 96 hpi para cada grupo experimental. Os dados foram obtidos por ELISA e expressos em pg/mL. Resultados apresentados como média ± desvio padrão; p < 0.05.	25
Figura 12- Produção de IL-10 em macrófagos infectados por <i>T. cruzi</i> e tratados com ciclosporina A. (A) Concentração de IL-10 aos 24 hpi em células controle, pré-tratadas e tratadas com ciclosporina A. (B) Concentração de IL-10 aos 96 hpi. (C) Comparação temporal dos níveis de IL-10 entre 24 e 96 hpi dentro de cada condição. As análises foram conduzidas por ELISA, com resultados expressos em média ± desvio padrão; p < 0.05.	26
Figura 13- Efeito da ciclosporina A na produção de IL-12 por macrófagos RAW 264.7 infectados por <i>T. cruzi</i> . (A) Concentração de IL-12 em 24 hpi nas condições Controle, Pré-tratamento e Tratamento. (B) Concentração de IL-12 em 96 hpi. (C) Comparação dos níveis de IL-12 entre 24 e 96 hpi para cada grupo. A quantificação foi realizada por ELISA, com os dados expressos em pg/mL como média ± desvio padrão; p < 0,05	27

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Chagas: aspectos gerais, históricos e epidemiológicos	1
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.2.1 Espécie e taxonomia.....	2
1.2.2 Formas evolutivas	2
1.2.3 Cepas Y e G de <i>T. cruzi</i>	4
1.2.4 Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i>	5
1.3 Sintomatologia e tratamento da Doença de Chagas	7
1.3.1 Fase aguda e fase crônica	7
1.3.2 Tratamento.....	8
1.3.3 Proteína calcineurina humana A e o gene PPP3CA	9
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivo geral.....	12
3.2 Objetivo específicos.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Cultura de células e parasitas	13
4.2 Inibição da Calcineurina A com Ciclosporina A.....	13
4.3 Ensaios de Viabilidade celular e parasitária	13
4.4 Tratamentos e Grupos Experimentais	14
4.5 Ensaios de invasão celular e multiplicação intracelular	14
4.6 Dosagem de Óxido Nítrico (NO).....	15
4.7 Dosagem de Citocinas.....	15
4.8 Bioestatística	15
5. RESULTADOS.....	16
5.1 Efeito da ciclosporina A sobre <i>T. cruzi</i> Y e viabilidade de macrófagos RAW 264.7	16
5.2 Invasão de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y em macrófagos RAW 264.7 tratados com ciclosporina A	18
5.3 Avaliação da multiplicação intracelular do <i>T. cruzi</i> em diferentes tempos pós-infecção...	19
5.4 Produção de óxido nítrico (NO) pelas células RAW 264.7 infectadas e tratadas com ciclosporina A.....	21
5.5 Dosagem de citocinas em macrófagos infectados com <i>T. cruzi</i> sob modulação com ciclosporina A	22
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÃO	31
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas: aspectos gerais, históricos e epidemiológicos

A doença de Chagas, também chamada de tripanossomíase americana, é uma doença tropical negligenciada, causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*. Estima-se que mundialmente há cerca de 6 a 7 milhões indivíduos infectados com o *T. cruzi*. A doença apresenta maior incidência na América Latina, com cerca de 21 países endêmicos (WHO, 2025). Entretanto, a doença tem avançado para países não endêmicos, devido à alta taxa de migração internacional (Dias et al., 2016).

A doença de chagas foi descrita pela primeira vez no ano de 1909, pelo pesquisador Carlos Chagas, no estado de Minas Gerais, Brasil, iniciando os estudos dos aspectos clínicos da doença (Dias, 2015). Porém, há evidências que sugerem casos de infecção pelo *T. cruzi* em humanos desde tempos remotos. Em um estudo realizado com múmias exumadas no Peru e no Chile, pesquisadores utilizaram a datação por carbono para analisar tecidos preservados, e assim, confirmaram a presença do parasita através de vestígios de DNA (Chao et al., 2020).

A transmissão dessa doença pode acontecer de diversas formas, como o contato do vetor com o hospedeiro, por meio das fezes do inseto contaminado com *T. cruzi*. O consumo de alimentos ou bebidas infectados, transmissão vertical, transfusão de sangue, transplantes de órgãos e acidentes laboratoriais (Cucunubá et al., 2024). Além disso, os ciclos de transmissão do parasita envolvem mais de 150 espécies de mamíferos hospedeiros domésticos, e selvagens, podendo se contaminarem por alguma das vias de transmissão (Monteiro et al., 2018).

Considerando que nos últimos anos houve redução na transmissão por meio de vetores, com melhorias nas condições habitacionais, a doença de Chagas ainda é considerada endêmica em toda a América Latina, com cerca de 75 milhões de pessoas sob risco da infecção (Bern et al., 2019). Entre o início da década de 1990 e 2010, estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) indicaram que a prevalência da doença teve redução de 18 para 6 a 8 milhões de pessoas infectadas, e a incidência reduziu de aproximadamente 200.000 para 40.000 novos casos por ano (CUCUNUBÁ et al., 2024).

Dessa forma, apesar de a doença de Chagas ter sido retratada a mais de cem anos e dos esforços contínuos para seu controle, a doença ainda representa um grave problema de saúde pública e social. Ademais, é alarmante a crescente disseminação da doença para países não endêmicos, ressaltando a importância de estudos sobre a doença e de desenvolvimento de estratégias para seu enfrentamento (Lannes-Vieira et al. 2010).

1.2 *Trypanosoma cruzi*

1.2.1 Espécie e taxonomia

O agente etiológico da doença de Chagas, o *Trypanosoma cruzi*, pertence a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e ao subgênero *Schizotrypanum* (Hodo et al., 2016; Moreno et al., 2019). A família apresenta como característica principal a presença de apenas uma mitocôndria e de flagelo, o qual se estende ao longo de todo corpo celular. A matriz mitocondrial apresenta uma complexa estrutura de fibras de DNA, chamada de cinetoplasto (kDNA) (de Souza, 1984).

Essa família é caracterizada por apresentar 1 ou 2 flagelos que se originam de uma abertura, chamada de bolsa flagelar, e geralmente possuem uma estrutura adicional chamada paraflagelar (Fiocruz, 2015). Além disso, os Trypanosomatidae são flagelados digenéticos que durante o ciclo de vida apresenta uma evolução morfológica, no qual de acordo com as hipóteses filogenéticas, foi possível caracterizar o subgênero *Schizotrypanum* (Oliveira, 1986).

1.2.2 Formas evolutivas

O *Trypanosoma cruzi* é um parasita heteroxeno, com ciclo de vida complexo, envolvendo um inseto vetor e um hospedeiro mamífero. A espécie apresenta formas diferentes ao longo do ciclo, com diferenças morfológicas e funcionais em diferentes hospedeiros, podendo serem identificadas por microscopia de luz, e coradas por um corante chamado Giemsa (de Souza, 1984).

Em seu ciclo biológico, o *T. cruzi* apresenta 3 formas evolutivas: tripomastigotas metacíclicos, amastigotas e epimastigotas (Martins-Melo et al., 2014) (Figura 1).

A forma tripomastigota do parasita é uma forma alongada, com cinetoplasto alongado e localizado na região posterior ao núcleo. O seu flagelo é livre na região anterior, emergindo e aderindo ao longo do corpo do parasita. O tripomastigota é a forma infectante do parasita, e é encontrada no inseto vetor, em sua porção final do sistema digestivo, e nos hospedeiros vertebrados, no sangue e espaço intercelular (Costa et al., 2013)

A forma amastigota é encontrada principalmente no interior das células hospedeiras nos tecidos infectados do hospedeiro vertebrado (Canuto, 2016). Esta forma apresenta forma arredondada, com um flagelo curto, e cinetoplasto em forma de barra na região anterior ao núcleo (Silva, 2023a).

E por fim, os epimastigota são formas flageladas que apresentam cinetoplasto localizado anteriormente ao núcleo, e membrana ondulante menos desenvolvida, sendo encontrados no trato digestivo do inseto vetor (Silva, 2023b).

No ciclo biológico do parasita, a forma epimastigota, é considerada replicativa, resultando em formas tripomastigotas, as quais são infecciosas e não replicativas. Os tripomastigotas, após invadirem as células do hospedeiro mamífero, diferenciam-se em amastigotas no citoplasma, onde perdem o flagelo e assumem esta forma arredondada, dando início a fase replicativa intracelular por divisão binária. Estas transformações morfológicas representam um importante mecanismo de adaptação do *T. cruzi*, permitindo sua sobrevivência diante das mudanças no meio em que se encontra (Moreno et al., 2019).

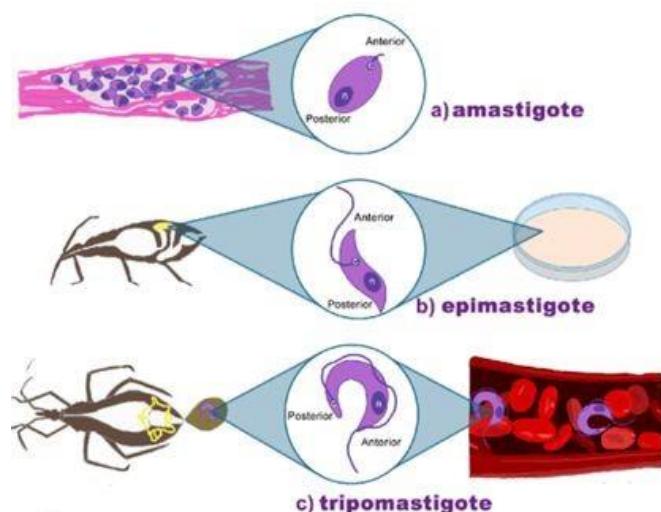


Figura 1- Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. (a) **Amastigotas:** Forma evolutiva arredondada, encontrada em tecidos do hospedeiro vertebrado. (b) **Epimastigotas:** forma

replicativa e flagelada, encontrada no trato digestivo do inseto vetor. (c) **Tripomastigotas:** formas flageladas não replicativas, encontradas no final do sistema digestivo do vetor, e no sangue e espaço intercelular do hospedeiro vertebrado (Peña-Callejas et al., 2022)

1.2.3 Cepas Y e G de *T. cruzi*

O *T. cruzi* apresenta uma alta diversidade genética e fenotípica intraespecífica, em que a propagação das populações naturais do parasita baseia-se na sua clonalidade e em suas trocas genéticas (Brenière et al., 2016). Diante disso, em 2009, uma classificação foi estabelecida para nomear as diferenças genotípicas de cada cepa do *T. cruzi*, com base na estrutura genética do DNA genômico e mitocondrial do cinetoplasto (Callejas-Hernández et al., 2018; Herreros-Cabello et al., 2019). Assim, criou-se 7 subdivisões de Unidade de Tipificação Discreta (DTUs), TcI a TcVI, e mais recentemente, a Tcbat (Ramírez et al., 2017).

Analizando características biológicas e bioquímicas e abordagens moleculares, com os estudos de mini-exos, multilocus e sequências de DNA ribossomal, foi estabelecida essa classificação dos subgêneros da linhagem do *T. cruzi*. Esses subgrupos são classificados de acordo com a sua proximidade genética, e são identificados por marcadores genéticos, moleculares ou imunológicos (Herreros-Cabello et al., 2020).

Dessa forma, cada subgrupo do parasita representa um tipo de cepa diferente, o subgrupo TcI é representado pela cepa G, enquanto o subgrupo TcII é representado pela cepa Y. Cada uma dessas cepas apresentam uma interação com as células hospedeiras distintas, levando a uma infectividade diferente em cada caso (Fernandes, 2013). Com relação à patogenicidade e infectividade, o TcII (cepa Y) apresenta maior capacidade patogênica *in vivo*, em comparação com outras que não causam grandes alterações clínicas em seus hospedeiros, como é o caso no TcI (cepa G) (Herreros-Cabello et al., 2019).

Estudos apontam que as diferentes cepas do *T. cruzi* são encontradas em regiões distintas, sendo que na região da América continental é encontrado principalmente as DTUs TcI (cepa G) e TcII (cepa Y) (Magalhães et al., 2015). A DTU TcI é associada tanto ao ciclo silvestre quanto doméstico, e possui uma distribuição do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina e Chile, sendo a principal cepa responsável pelos casos da doença na região endêmica da bacia amazônica. Já as cepas

TcII, V e VI são associadas a ciclos domésticos da doença presentes principalmente nos países do sul da América do Sul (Ramírez et al., 2014).

1.2.4 Ciclo biológico do *T. cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* possui um ciclo de vida complexo, envolvendo um inseto da subfamília Triatominae como seu vetor, e uma gama de hospedeiros mamíferos (Liu et al., 2020). Há mais de 130 espécies de triatomíneos, sendo três espécies consideradas principais vetores do *T. cruzi*, a *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* (Rassi et al., 2012) (Figura 2).

Os triatomíneos, popularmente conhecidos como “barbeiros”, apresentam cinco estágios de desenvolvimento em ambos os sexos, sendo que qualquer um desses estágios, o inseto pode abrigar o *T. cruzi*, atuando como hospedeiro. A probabilidade de um triatomíneo estar infectado com o parasita aumenta de acordo com os ciclos de refeições de sangue realizados ao longo do período de vida do inseto, por tanto, os insetos adultos e mais velhos apresentam uma maior probabilidade de infecção (Rassi & Marin-Neto, 2010; Rodrigues Coura, 1999).

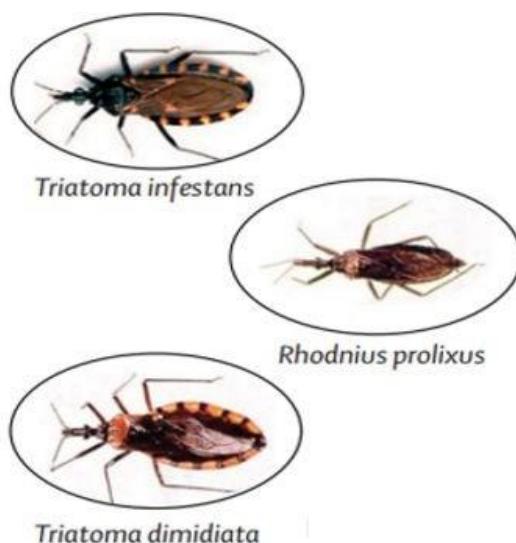


Figura 2- Principais espécies de triatomíneos que atuam como vetores do *T. cruzi*. Fonte: (Rassi & Marin-Neto, 2010)

Considerando a via de transmissão vetorial, o ciclo da doença de chagas (Figura 3) inicia-se quando a fêmea hematófaga do triatomíneo ao realizar o repasto

sanguíneo em um animal vertebrado infectado por *T. cruzi*, ingere sangue contaminado com formas tripomastigotas do parasita. A maioria dos parasitas ingeridos são mortos no estômago do inseto, os parasitas sobreviventes, se transformam em epimastigotas replicativos e movem-se para o intestino médio do inseto, onde se multiplicam. Posteriormente, os epimastigotas migram para o reto, porção final do trato digestivo do inseto, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infecciosos (Onyekwelu & Onyekwelu, 2019).

Essa etapa de transformação do parasita, de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, é chamada de metacilogênese, processo que depende diversos fatores estimulatórios, como fome nutricional, AMP cíclico e adenilato ciclase (Gonzales-Perdomo et al., 1988).

Os tripomastigotas metacíclicos são secretados nas fezes do triatomíneo durante o próximo repasto sanguíneo em outro vertebrado, e assim penetram a pele através da ferida provocada pelo inseto vetor, ou por meio das mucosas (Martín-Escalano et al., 2022). Ao penetrar no hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas são capazes de invadir uma ampla gama de células nucleadas, como macrófagos, fibroblastos, e diversas outras linhagens celulares (Tyler & Engman, 2001).

Após invadir uma célula, ocorre a formação de um vacúolo em volta dos parasitas, chamado de vacúolo parasitóforo (PV), no qual os tripomastigotas metacíclicos se diferenciam em formas amastigotas replicativos, conseguindo escapar do PV para o citoplasma celular (Tyler & Engman, 2001). No citoplasma celular, os amastigotas entram em estágio de proliferação por fissão binária, multiplicando-se intensamente até chegar ao ponto em que a célula hospedeira esteja toda preenchida com parasitas. Posteriormente, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigota, que devido a sua constante agitação de flagelos provocam a lise da célula (Martín-Escalano et al., 2022).

Estando livres na corrente sanguínea, os tripomastigotas sanguíneos podem invadir novas células próximas do local de infecção, ou através da corrente circulatória, alcançam diversos tecidos do hospedeiro vertebrado, invadindo diferentes tipos celulares (de Souza et al., 2010). Os tripomastigotas livres na corrente sanguínea podem ser sugados novamente pelos triatomíneos, iniciando novamente o ciclo biológico do *T. cruzi* (Bern, 2015).

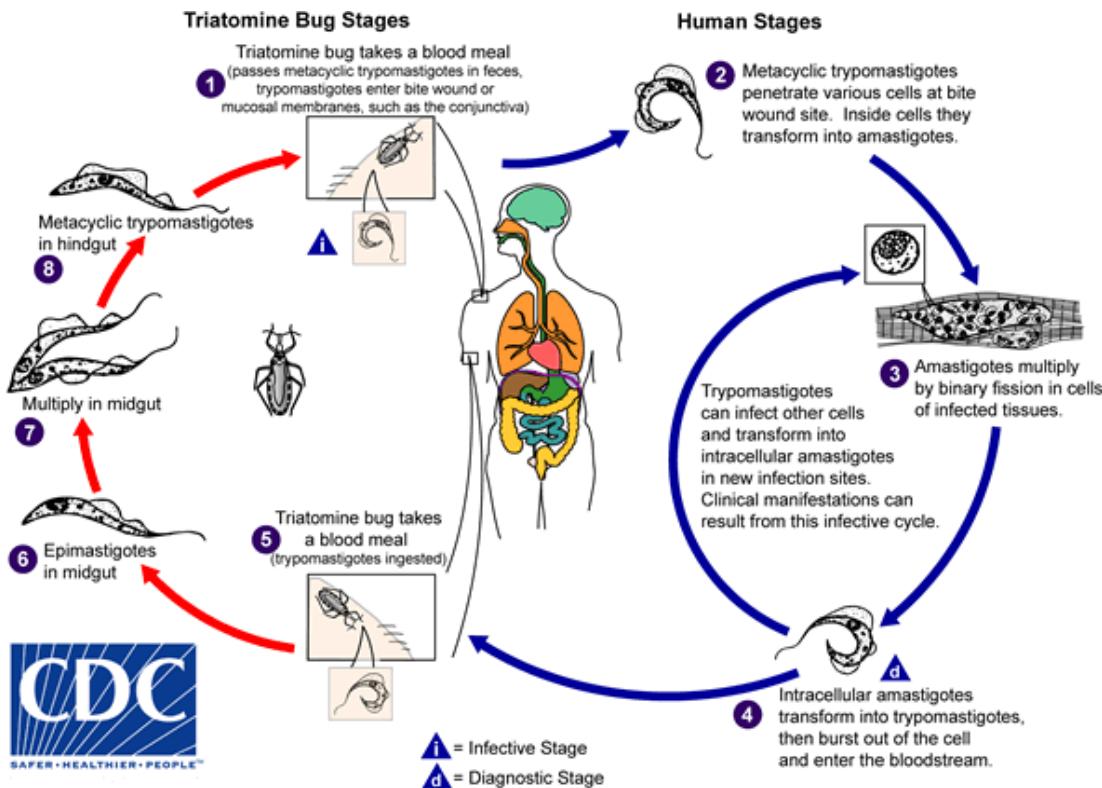


Figura 3- Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Centro de Controle de Doenças e Prevenção, USA

1.3 Sintomatologia e tratamento da Doença de Chagas

1.3.1 Fase aguda e fase crônica

A Doença de Chagas pode apresentar três fases clínicas distintas: fase aguda, crônica e indeterminada.

A fase aguda é caracterizada por baixa mortalidade e sintomatologia, inicia-se 1 semana após a infecção inicial, entretanto 1 a cada 30 pacientes apresentam sintomas e sinais relevantes, como febre, aumento dos linfonodos e inchaço em uma única pálpebra. Nesta fase da doença é possível a identificação de parasitas na corrente sanguínea, através de testes sorológicos revelando os anticorpos IgM para o *T.cruzi* (Umezawa et al., 2001). Após um mês da infecção primária, há diminuição da carga parasitária, com isso, os indivíduos infectados podem progredir para a fase crônica silenciosa, uma vez que a ausência ou inespecificidade dos sintomas dificulta o diagnóstico e possível tratamento da doença (Schijman et al., 2022).

A fase aguda da doença é sucedida pela fase crônica geralmente assintomática, que pode durar anos ou se estender por toda a vida (Herreros-Cabello et al., 2019). Nesta fase não há alta parasitemia sanguínea, logo parasitas não são facilmente detectados no sangue de pacientes. Esta fase da doença pode ser subdividida, de acordo com as características clínicas apresentadas: forma indeterminada, cardíaca e digestiva (Prata, 1994).

A forma indeterminada representa aqueles pacientes que não apresentam sintomas e não são diagnosticados com doenças de características cardíacas, gastrointestinais ou neurológicas. Esta forma da doença atinge cerca de 60 a 70% dos pacientes, sendo que 2 a 5% podem evoluir ou converter para as formas cardíacas ou digestivas (Umezawa et al., 2001).

Na fase crônica clínica, aproximadamente 40% dos pacientes desenvolvem complicações como miocardite crônica, megavisceras ou ambas, geralmente entre 10 e 30 anos após a infecção (Herreros-Cabello et al., 2019). A forma cardíaca é tratada como uma cardiomiopatia, também chamada de cardiomiopatia chagásica, podendo ser leve ou moderada e gerando insuficiência cardíaca. Já a forma crônica digestiva da doença, ocorre em aproximadamente 10% dos casos, e provoca disfunção motora do esôfago e/ou do cólon, causando megaesôfago e/ou megacôlon. A forma digestiva da doença pode estar associada à forma cardíaca, quando as formas digestiva e cardíaca ocorrem simultaneamente, é chamada de forma mista ou cardio-digestiva (Umezawa et al., 2001).

1.3.2 Tratamento

Com o diagnóstico correto da Doença de Chagas, o paciente pode ser direcionado ao tratamento da doença, visando eliminar ou reduzir a carga parasitária. O tratamento adequado possibilita a conversão do quadro da doença em cronicamente controlada (Viotti et al., 2014).

Atualmente, os únicos medicamentos usados para o tratamento da doença de Chagas são o benzonidazol e o nifurtimox. O benzonidazol é o único disponível no Brasil, sendo disponibilizado gratuitamente pelo Ministério da Saúde na rede pública e para projetos de pesquisas científicas (Belmino et al., 2024; Forsyth et al., 2016).

O tratamento em indivíduos que estão na fase aguda deve ser realizado imediatamente após a confirmação da infecção, e apresenta alta eficácia (Siqueira-

Batista et al., 2011). Já na fase crônica, o tratamento apresenta baixa eficácia, mas também deve ser iniciado logo após a confirmação do diagnóstico (Oliveira et al., 2008). Indivíduos tratados na fase crônica demonstram menor progressão da doença, principalmente quando iniciado o tratamento imediatamente após a identificação da doença (Forsyth et al., 2016).

Ambos os medicamentos usados para o tratamento da doença, apresentam efeitos adversos variáveis (Viotti et al., 2014). O Benznidazol, é o medicamento mais usado no tratamento da doença, pelo fato de apresentar menor duração de tratamento e efeitos adversos menos graves do que o nifurtimox. Entre os efeitos adversos mais comuns do benznidazol destaca-se quadros de dermatite alérgica. O nifurtimox pode causar efeitos adversos graves e variáveis, como complicações gástricas, psiquiátricas e neurológicas (Forsyth et al., 2016).

Se faz necessário uma supervisão rigorosa dos pacientes que são tratados com os medicamentos disponíveis, pois os riscos de efeitos adversos são graves, principalmente em adultos, e podem levar à interrupção do tratamento. Com o acompanhamento cuidadoso por uma equipe clínica assistente, os medicamentos podem ser aplicados em todos os pacientes adultos infectados com até 50 anos de idade (Viotti et al., 2009). As contraindicações do uso desses medicamentos são em casos de gravidez, progressão cardíaca avançada e complicações hepáticas ou renais (Morillo et al., 2015)

1.3.3 Proteína calcineurina humana A e o gene PPP3CA

O gene PPP3CA, analisado pela primeira vez no ano de 1979, localiza-se no cromossomo humano 4 e é responsável por codificar a subunidade catalítica alfa da proteína fosfatase 3, também chamada de calcineurina humana (CN) (Bai et al., 2022; Couto-Silva et al., 2023; Salgado et al., 2017). Apresentando uma ampla distribuição em vários tecidos humanos, a CN apresenta maior expressão em tecidos e células altamente excitáveis, como tecidos do sistema nervoso central, células musculares cardíacas e esqueléticas, e linfócitos T (Favaro et al., 2024; Gao & Wang, 2016; Kipanyula et al., 2016; Wan et al., 2014).

A proteína fosfatase-3 é a forma funcional, correspondendo à subunidade catalítica da calcineurina (calcineurina A), sendo composta por três domínios: catalítico (N-terminal), regulador (domínio de ligação à calmodulina e cálcio), e auto inibitório

(C-terminal). Para sua ativação, é essencial que o cálcio se ligue ao domínio regulador, induzindo uma mudança conformacional que desloca o domínio auto inibitório do sítio catalítico, permitindo a sua atividade enzimática. Esta proteína fosfatase é extremamente importante para a mediação de sinalização dependente de cálcio, realizando a fosforilação de inúmeras proteínas (Favaro et al., 2024).

A calcineurina humana apresenta inúmeras funções biológicas relacionadas a respostas celulares, como a ativação de células T, tráfego vesicular, crescimento celular e apoptose (Qian et al., 2018). A proteína fosfatase-3 está envolvida na via de sinalização complexo G- $\beta\gamma$, essencial na cascata de sinalização do receptor acoplado a proteína G, desempenhando um papel importante na ativação de células imunes (Couto-Silva et al., 2023).

Inibidores da calcineurina são muito usados em práticas clínicas como medicamentos imunossupressores (Imai et al., 2016). Os principais inibidores dessa proteína são a ciclosporina A (CsA) e FK506, no qual formam complexos com duas classes diferentes de imunofilinas, sendo elas ciclofilina e proteínas de ligação FK506. Os complexos formados pelo fármaco e pela imunofilina, ligam-se a proteína bloqueando o seu acesso ao substrato, impedindo a ativação. Estes imunossupressores foram propostos como bases para a criação de novas abordagens terapêuticas para o tratamento, principalmente, de doenças cardiovasculares (Parra & Rothermel, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

Diante das graves consequências que a doença de Chagas impõe à saúde humana e das limitações dos tratamentos atualmente disponíveis, torna-se essencial aprofundar o conhecimento sobre a proteína calcineurina humana e seu papel na infecção causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*. Também cabe destacar que a literatura científica ainda é escassa quanto à relação direta entre essa proteína e os mecanismos de infecção do parasita, o que evidencia a necessidade de novos estudos nessa área.

Investigar essa interação molecular, portanto, pode abrir novas possibilidades terapêuticas, contribuindo para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e com menos efeitos adversos. Considerando que os medicamentos utilizados atualmente são restritos e frequentemente associados a toxicidade significativa, compreender os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da doença, especialmente aqueles relacionados à calcineurina, representa um passo promissor para o avanço no combate à doença de Chagas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto da calcineurina humana A na modulação da infecção por *Trypanosoma cruzi* *in vitro*.

3.2 Objetivo específicos

- Avaliar a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 e dos tripamastigotas de *T. cruzi* submetidos ao tratamento com o imunossupressor Ciclosporina A.
- Investigar a influência da calcineurina humana A na invasão celular e multiplicação intracelular de parasitas selvagens da cepa Y de *T. cruzi* em macrófagos RAW 264.7.
- Medir a produção de óxido nítrico (NO) nos macrófagos infectados com *T. cruzi*, após o pré-tratamento ou tratamento com Ciclosporina A.
- Dosar as citocinas IL1- β , INF- γ , TNF- α , e IL-10 liberado pelos macrófagos infectados com *T. cruzi* e submetidos aos grupos de tratamento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de células e parasitas

Foram utilizadas células LLC-MK2, para manutenção do parasito selvagem da cepa Y de *T. cruzi* (WTY), as quais foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium - DMEM (Vitrocell/Embriolife). Para realização dos experimentos foram utilizados macrófagos da linhagem RAW 264.7, cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute). Ambos os meios são suplementados com L-glutamina (2mM) e D-glicose (4.500 mg/L), bicarbonato de sódio (2.000 mg/L), HEPES (2.380 mg/L), piruvato de sódio (1.100 mg/L), 10% de soro fetal bovino – SFB (Vitrocell/Embriolife), e os antibióticos penicilina (60 mg/L), gentamicina (40 mg/L) e estreptomicina (10 mg/L). As culturas de células e parasitas foram mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

4.2 Inibição da Calcineurina A com Ciclosporina A

Para avaliar o papel da calcineurina A na infecção por *Trypanosoma cruzi*, foi utilizada a Ciclosporina A (CsA) European Pharmacopoeia Reference Standards, um imunossupressor amplamente descrito como inibidor da calcineurina (Parra & Rothermel, 2017). A Ciclosporina A foi diluída, em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com SFB 10%, para concentração final de 0.5 µg/ml.

4.3 Ensaio de Viabilidade celular e parasitária

Por meio do ensaio de Alamar blue foi avaliado a viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 após o tratamento com ciclosporina A em diferentes concentrações (10 µg/ml à 0.1 µg/ml), nos tempos de 24 à 96 horas pós-tratamento. O Alamar blue detecta a atividade metabólica das células viáveis (Rampersad, 2012) A viabilidade de tripomastigotas selvagens da cepa Y de *T. cruzi* também foi verificada

utilizando o ensaio de alamar blue, com parasitas incubados em condições similares e analisados após 24 a 96 horas pós-tratamento.

Para validação do ensaio, foram utilizados controles: controle positivo (células viáveis), células cultivadas em condições normais e sem tratamento, e controle negativo (células inviáveis), células foram tratadas com DMSO a 50%, promovendo morte celular. Os resultados foram analisados por espectrofotometria (570 nm).

4.4 Tratamentos e Grupos Experimentais:

- Grupo Controle: macrófagos RAW expostas à infecção por *T. cruzi* sem tratamento com Ciclosporina.
- Grupo de Pré-tratamento: Células de macrófagos RAW tratadas com ciclosporina (0,05 µg/mL) por 1 hora antes da infecção com *T. cruzi*.
- Grupo de Tratamento: macrófagos RAW infectadas com *T. cruzi* e tratadas com ciclosporina (0,05 µg/mL) após a infecção.
- Grupo de Pré-tratamento + Tratamento: Células de macrófagos RAW tratadas com ciclosporina (0,05 µg/mL) por 1 hora antes da infecção com *T. cruzi* combinado com o tratamento contínuo após a infecção.

4.5 Ensaios de invasão celular e multiplicação intracelular

Macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados em placas de 24 poços (8×10^4 células/poço) sobre lamínulas de 13 mm e incubados a 37°C, 5% de CO₂ por 24 horas. A infecção ocorrerá utilizando tripomastigotas selvagens da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (MOI 5:1) por 2 horas. Após o período de invasão, foram realizadas lavagens com PBS 1X para remoção dos parasitas não internalizados.

Nos ensaios de invasão celular, após o período de 2 horas, as lamínulas foram submetidas a fixação e coloração por Kit rápido de Panótico. Nos ensaios de multiplicação celular, após o período inicial de invasão e lavagem de parasitas extracelulares, o meio de cultura foi renovado de acordo com os grupos experimentais estabelecidos, e as placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. As

lamínulas foram coletadas, fixadas e coradas ao longo de uma cinética de tempo de 24 a 96 horas pós infecção.

Para os ensaios de invasão celular foram utilizados os grupos experimentais, controle, pré-tratamento e tratamento (descritos tópico 4.6), e para os ensaios de multiplicação intracelular, os grupos controle e tratamento. As lamínulas foram analisadas por microscopia óptica para contagem dos parasitas internalizados.

4.6 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico dos grupos experimentais foi medida utilizando o método de Griess, técnica colorimétrica usada para dosar óxido nítrico (NO) de forma indireta, por meio da quantificação do nitrito (NO_2^-). Após a infecção com *T. cruzi*, o sobrenadante dos diferentes grupos experimentais (controle, pré-tratamento e tratamento) foram coletados e submetidos ao ensaio de Griess, e os resultados obtidos por meio de espectrofotometria (540 nm).

4.7 Dosagem de Citocinas

A quantificação de citocinas no sobrenadante das culturas de macrófagos RAW 264.7 infectados por *Trypanosoma cruzi* nos diferentes grupos experimentais foram realizadas utilizando kits comerciais de ELISA. Os grupos experimentais incluíram:

- Controle: células não infectadas
- Pré-tratamento: células tratadas com CsA 1 hora antes da infecção.
- Grupo de Tratamento: células tratadas com CsA após a infecção.

Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C. O ELISA foi realizado conforme as instruções do fabricante, utilizando anticorpos específicos para as citocinas analisadas: IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12. A leitura foi feita em espectrofotômetro, leitura em 450 nm, e as concentrações foram determinadas por interpolação na curva-padrão.

4.8 Bioestatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados foram analisados por meio de testes estatísticos apropriados, como ANOVA seguida de teste post-hoc (Tukey ou Bonferroni), para comparação entre os grupos. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito da ciclosporina A sobre *T. cruzi* Y e viabilidade de macrófagos RAW 264.7

A avaliação dos efeitos da ciclosporina A (CsA) foi conduzida tanto sobre os parasitas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (WTY) quanto sobre células murinas da linhagem RAW 264.7, com o objetivo de determinar a toxicidade parasitária e a segurança do composto frente às células hospedeiras.

A exposição dos triatomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* à ciclosporina A demonstrou um efeito tóxico dependente da concentração e do tempo de tratamento (Figura 4). Após 24 horas, a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ já apresentou redução significativa da viabilidade parasitária ($p = 0,0004$), enquanto as demais concentrações não mostraram diferenças estatísticas relevantes nesse intervalo (Fig. 4A). Com 48 horas de tratamento, observou-se maior toxicidade com as concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,002$) e 7,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,04$), indicando possível efeito acumulativo (Fig. 4B). Após 72 horas, a toxicidade foi significativamente maior nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,0024$) e 7,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,048$), sendo observada também uma tendência de redução de viabilidade em 5 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 4C). As 96h, os dados foram apresentados como percentual de viabilidade, evidenciando uma redução marcada na presença de 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,0007$) e 7,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,01$) (Fig. 4D). As concentrações de 2,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$ não promoveram toxicidade significativa ao longo do período analisado.

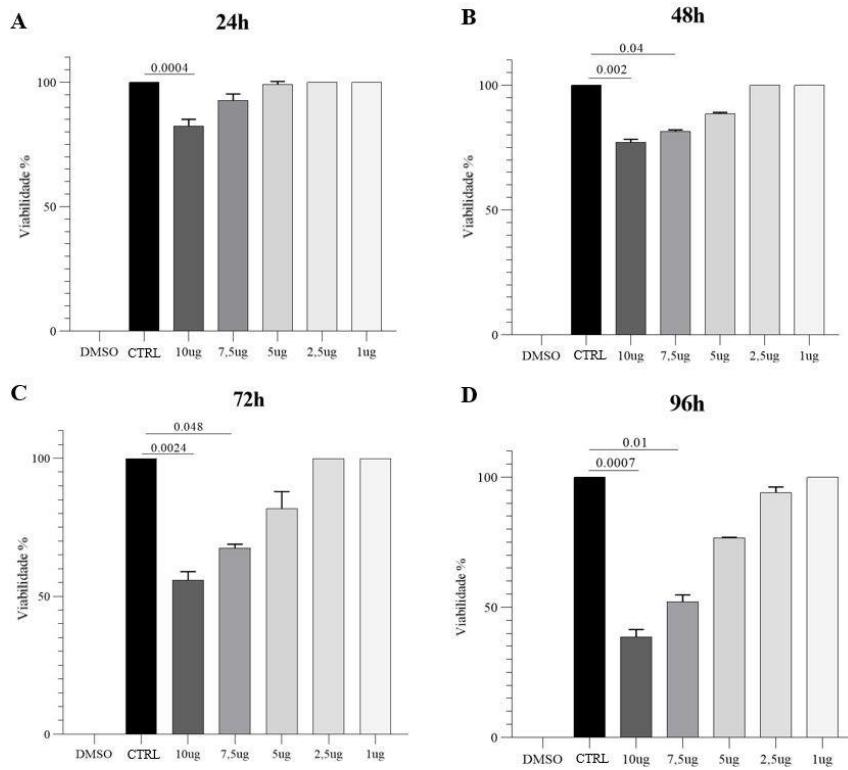


Figura 4- Avaliação da toxicidade da ciclosporina A sobre tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição. Os parasitas foram tratados com diferentes concentrações da droga (10 µg/mL, 7,5 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL e 1 µg/mL), sendo DMSO e controle sem tratamento (CTRL) utilizados como referência. A toxicidade foi expressa em porcentagem de células viáveis nos tempos de 24h, 48h e 72h, e 96h. Resultados representam média ± erro padrão. Diferenças estatísticas significativas foram indicadas com os respectivos valores de p (ANOVA seguida de teste de Tukey).

Em paralelo, foi avaliada a viabilidade das células RAW 264.7 expostas às mesmas concentrações de ciclosporina A (Figura 5). Nas primeiras 24 horas, todas as concentrações mantiveram viabilidade acima de 95%, com diferença significativa na viabilidade celular apenas na condição de 10 µg/mL ($p = 0,005$) (Fig. 5A). Após 48, 72 e 96 horas de tratamento, apenas as concentrações de 10 µg/mL ($p = 0,002$) e 7,5 µg/mL ($p = 0,04$), apresentaram leve citotoxicidade, enquanto as concentrações de 5 µg/mL ou menores mantiveram taxas de viabilidade superiores a 85% até 96h pós-tratamento (Fig 5B-D).

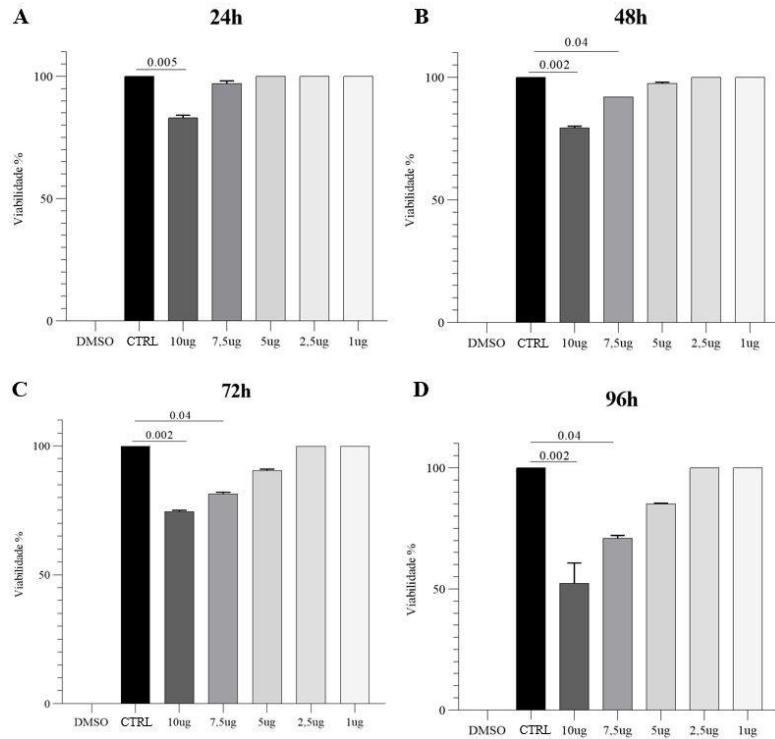


Figura 5- Viabilidade das células RAW 264.7 tratadas com ciclosporina A nas concentrações de 10 µg/mL, 7,5 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL e 1 µg/mL, avaliada após 24, 48, 72 e 96 horas. Os grupos controle (CTRL) e DMSO foram incluídos como comparativos. A viabilidade foi expressa em percentual de células vivas. Resultados apresentados como média ± erro padrão, com indicação dos valores de p para comparações estatísticas significativas (ANOVA seguida de teste de Tukey).

Os resultados sugerem que a ciclosporina A nas concentrações de 10 e 7,5 µg/mL apresenta maior toxicidade para as células RAW 264.7 e para os parasitas *T. cruzi* cepa Y, ao passo que em concentrações ≤ 5 µg/mL mantém viabilidade satisfatória configurando-se como uma dose potencialmente eficaz e segura para uso experimental.

5.2 Invasão de *Trypanosoma cruzi* cepa Y em macrófagos RAW 264.7 tratados com ciclosporina A

A capacidade de invasão do *T. cruzi* (cepa Y) foi avaliada em células RAW 264.7 submetidas a diferentes condições de tratamento com ciclosporina A (CsA, 0,05 µg/mL) (Figura 6). Os dados demonstram que o pré-tratamento com CsA, tanto isoladamente (PRÉ) quanto combinado com o tratamento contínuo após a infecção (PRÉ+TRAT), resultou em redução significativa no número de células infectadas em 100 células analisadas, em comparação ao grupo controle não tratado (CTRL). O grupo

PRÉ apresentou uma média de células infectadas significativamente inferior ao grupo CTRL ($p = 0,001$), enquanto o grupo PRÉ+TRAT apresentou redução ainda mais significativa ($p = 0,0007$). Já o grupo tratado somente após a infecção (TRAT) não apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo controle, embora uma leve redução tenha sido observada. Esses dados sugerem que a exposição das células à CsA antes da infecção interfere na capacidade de invasão do parasita.

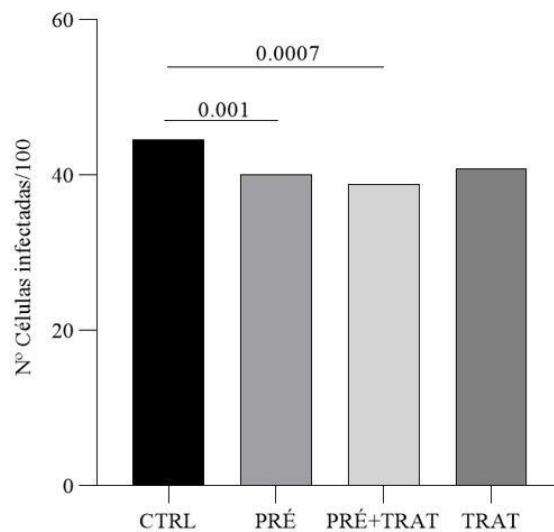


Figura 6- Avaliação da invasão de *T. cruzi* cepa Y em células RAW 264.7 sob diferentes condições de tratamento com ciclosporina A. O gráfico apresenta o número médio de células infectadas por 100 células analisadas. As condições experimentais foram: controle (CTRL, sem tratamento), pré-tratamento com ciclosporina A (PRÉ), pré-tratamento seguido de tratamento contínuo (PRÉ+TRAT) e tratamento apenas após a infecção (TRAT). Observa-se redução significativa no número de células infectadas nos grupos PRÉ ($p = 0,001$) e PRÉ+TRAT ($p = 0,0007$), quando comparados ao grupo controle. Dados expressos como média \pm DP.

5.3 Avaliação da multiplicação intracelular do *T. cruzi* em diferentes tempos pós-infecção

A cinética da infecção intracelular foi avaliada em 24, 48, 72 e 96 horas pós-infecção (hpi), com base na contagem do número de células infectadas contendo diferentes cargas parasitárias (1, 2–5, 6–10 e >10 parasitas) (Figura 7), bem como na média de parasitas em 100 células infectadas (Figura 8).

Após 24h de infecção, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e tratado, independentemente da carga parasitária

por célula (Fig. 7A). Contudo, 48 hpi, o grupo tratado apresentou menor proporção de células infectadas contendo 2–5 parasitas ($p = 0,04$) e maior número de células com apenas 1 parasita ($p = 0,003$), em comparação ao controle (Fig. 7B). Isso sugere que o tratamento limitou a replicação inicial dos parasitas no interior das células hospedeiras.

As 72 hpi, observou-se redução significativa no número de células infectadas com 6–10 parasitas ($p = 0,01$) no grupo tratado, e maior número de células infectadas com 2–5 parasitas ($p = 0,04$), em comparação ao controle (Fig. 7C). Após 96h de infecção, o grupo tratado apresentou maior número de células infectadas com 2–5 parasitas ($p = 0,01$), embora as demais categorias não tenham diferido estatisticamente (Fig. 7D).

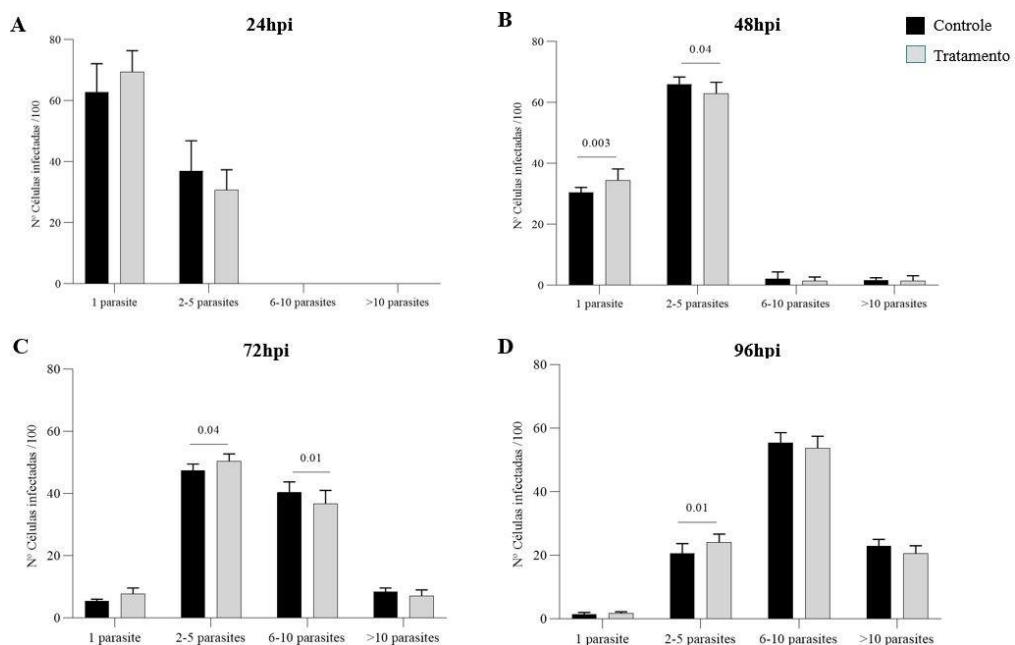


Figura 7- Cinética de infecção intracelular por *T. cruzi* cepa Y em células RAW 264.7 tratadas ou não com ciclosporina A. Distribuição do número de células infectadas por 100 células analisadas, de acordo com a carga parasitária intracelular (1, 2–5, 6–10 e >10 parasitas) nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas pós-infecção (hpi). Os grupos controle (preto) e tratado com ciclosporina A (cinza claro) foram comparados por análise estatística. Dados expressos como média \pm DP.

Além disso, o número médio de parasitas intracelulares em 100 células infectadas totais foi significativamente menor nos grupos tratados nos tempos de 48 hpi ($p = 0,001$) e 72 hpi ($p = 0,02$), indicando redução na carga parasitária. As 96 hpi,

embora ainda se observasse uma tendência de diminuição no grupo tratado, a diferença não alcançou significância estatística (Fig. 8).

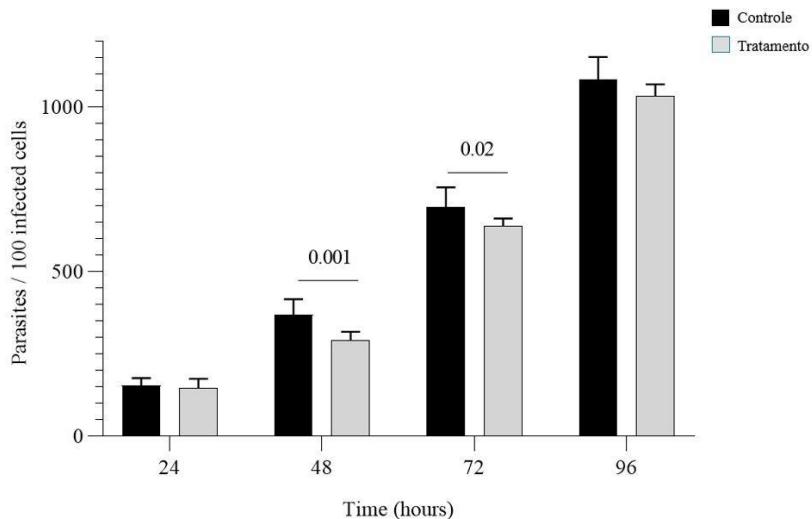


Figura 8- Número médio de parasitas intracelulares por 100 células infectadas em diferentes tempos pós-infecção com *T. cruzi* cepa Y. Gráfico de barras representando a média de parasitas intracelulares por 100 células infectadas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas pós-infecção. Comparação entre grupo controle (preto) e grupo tratado com ciclosporina A (cinza claro). Dados expressos como média \pm DP.

5.4 Produção de óxido nítrico (NO) pelas células RAW 264.7 infectadas e tratadas com ciclosporina A

A produção de óxido nítrico (NO) foi quantificada nos tempos de 24, 48, 72 e 96 hpi, nos grupos controle negativo (C-), controle positivo infectado (C+), células pré-tratadas com CsA (PRÉ) e células tratadas após infecção (TRAT) (Figura 9A-D). Em todos os tempos analisados, observou-se aumento significativo na produção de NO no grupo C+ em comparação ao C-, confirmando a ativação da resposta inflamatória frente à infecção pelo parasita.

Após 24h de infecção, a concentração de NO no grupo pré-tratado foi significativamente maior em relação ao grupo C- ($p = 0,003$), enquanto o grupo TRAT apresentou valores intermediários, sem diferença estatística (Fig. 9A). Ao longo da cinética temporal observada posteriormente, 48 à 96hpi, o grupo C+ apresentou os níveis mais elevados de NO, superiores aos grupos pré-tratados e tratados (Fig. 9B-D), indicando que a ciclosporina A atenuou a resposta inflamatória mediada por NO ao longo da infecção.

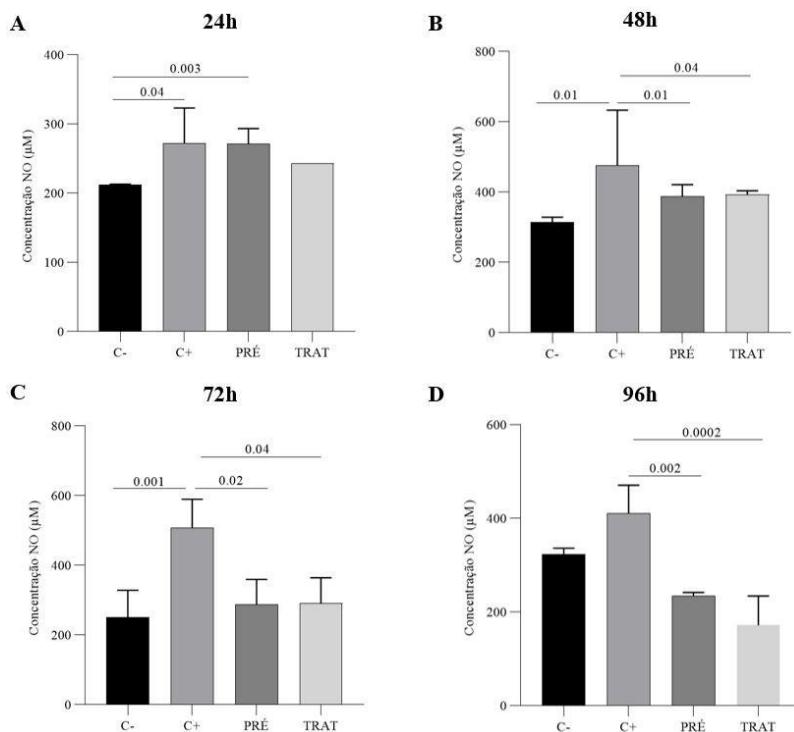


Figura 9- Produção de óxido nítrico (NO) por células RAW 264.7 infectadas com *T. cruzi* cepa Y e submetidas a diferentes condições de tratamento com ciclosporina A. Concentração de NO (μM) medida por reação de Griess nos tempos de 24 h, 48 h, 72 h e 96 h pós-infecção. Foram avaliados os seguintes grupos: controle negativo (C-), controle positivo infectado (C+), pré-tratamento com ciclosporina A (PRÉ) e tratamento após infecção (TRAT). Dados expressos como média \pm DP.

5.5 Dosagem de citocinas em macrófagos infectados com *T. cruzi* sob modulação com ciclosporina A

A produção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12 foi avaliada em sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 infectados com a cepa selvagem Y de *Trypanosoma cruzi*, com ou sem modulação por ciclosporina A (Figuras 10-13).

A análise da produção de IL-1 β revelou que a infecção por *T. cruzi* induziu níveis elevados dessa citocina pró-inflamatória no grupo controle, tanto em 24 quanto em 96 hpi (Figura 10 A-C). No entanto, a modulação com ciclosporina A resultou em uma inibição significativa da secreção de IL-1 β . Em 24 hpi, o grupo pré-tratado e tratado, apresentaram redução na produção da citocina em comparação ao controle, $p < 0,0001$ e $0,0504$, respectivamente (Fig. 10A). Em 96 hpi, essa inibição se manteve, sendo estatisticamente significativa tanto para o grupo pré-tratamento em relação ao controle ($p < 0,0001$), quanto para o grupo tratamento em comparação ao pré-

tratamento ($p = 0,0001$) (Fig. 10B). A análise temporal demonstrou que a produção de IL-1 β aumentou significativamente entre 24 e 96 hpi apenas no grupo tratado ($p = 0,0002$), sugerindo uma recuperação tardia da resposta inflamatória (Fig. 10C).

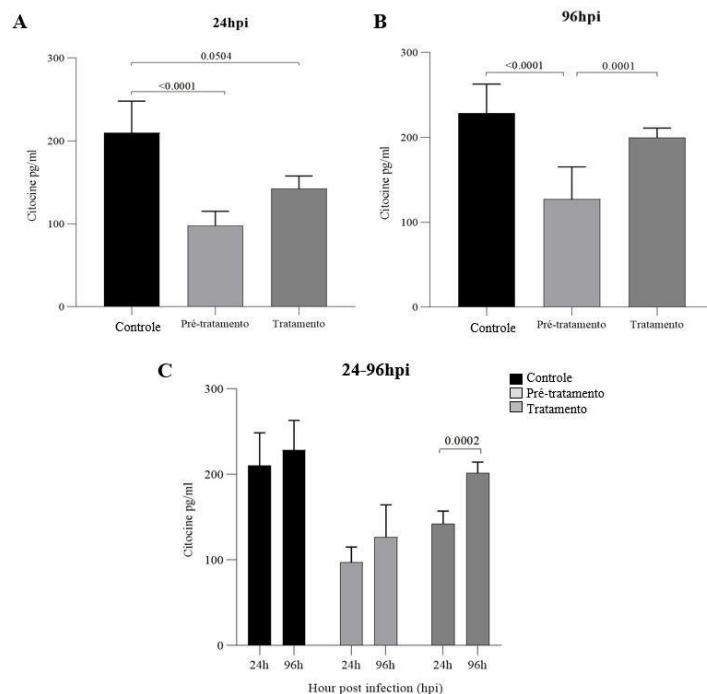


Figura 10- Produção de IL-1 β por macrófagos RAW 264.7 infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados com ciclosporina A. (A) Concentração de IL-1 β em sobrenadantes de culturas de macrófagos em 24 horas pós-infecção (hpi), nas condições: Controle (células não tratadas), Pré-tratamento (ciclosporina A administrada 1h antes da infecção), e Tratamento (ciclosporina A administrada após a infecção). (B) Concentração de IL-1 β aos 96 hpi nas mesmas condições experimentais. (C) Comparação temporal entre 24 e 96 hpi para cada condição experimental. As dosagens foram realizadas por ELISA. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão; $p < 0,05$.

A citocina IL-6 apresentou padrão semelhante, com redução significativa nos grupos modulados (Figura 11). Em 24 hpi, observou-se uma queda significativa da produção de IL-6 no grupo pré-tratado e tratado em comparação ao controle ($p = 0,01$ e $0,003$) (Fig. 11A). Em 96 hpi, a produção permaneceu inibida no grupo pré-tratado em relação ao controle ($p < 0,0001$) e foi significativamente maior no grupo tratado em comparação ao pré-tratado ($p = 0,04$), indicando que o tratamento pós-infecção restaura parcialmente os níveis de IL-6 (Fig. 11B). Temporalmente, houve redução significativa da IL-6 no grupo tratado entre 24 e 96 hpi ($p = 0,002$) (Fig. 11C).

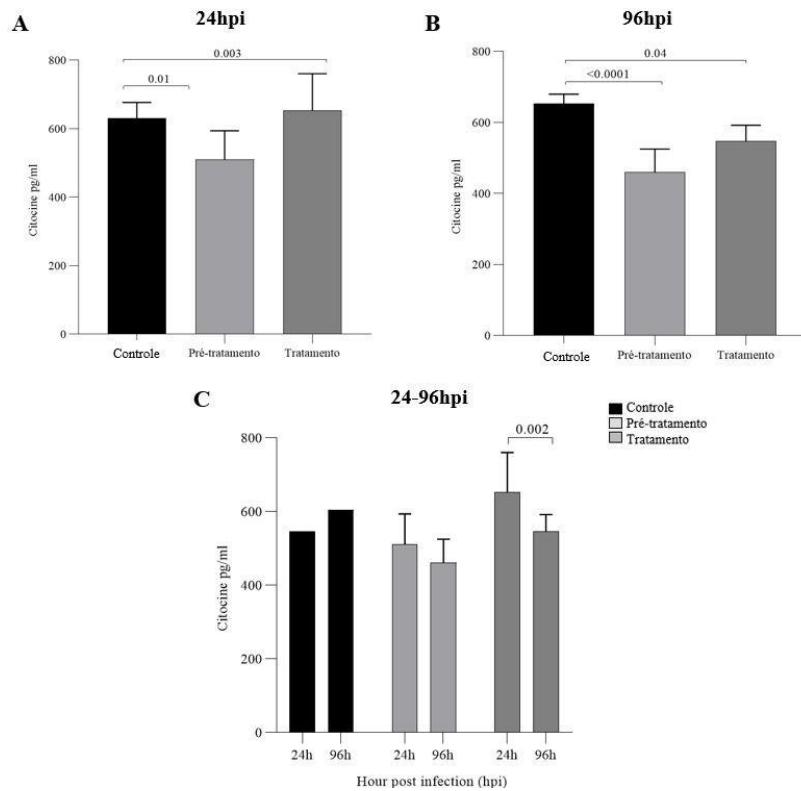


Figura 11- Avaliação da produção de IL-6 em macrófagos RAW 264.7 infectados por *T. cruzi* e submetidos à modulação com ciclosporina A. (A) Níveis de IL-6 aos 24 hpi nas condições de Controle, Pré-tratamento e Tratamento com ciclosporina A. (B) Níveis de IL-6 aos 96 hpi. (C) Análise comparativa da produção de IL-6 entre 24 e 96 hpi para cada grupo experimental. Os dados foram obtidos por ELISA e expressos em pg/mL. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão; $p < 0.05$.

A análise da IL-10 revelou um perfil oposto, com aumento da produção induzido pelo tratamento com ciclosporina A (Figura 12). Em 24 hpi, o grupo pré-tratado apresentou redução significativa dos níveis de IL-10 em comparação ao controle ($p = 0,01$), enquanto o grupo tratado exibiu um aumento marcante em relação ao pré-tratado ($p = 0,0003$), sugerindo que a administração da droga após a infecção estimula a resposta anti-inflamatória (Fig. 12A). Em 96 hpi, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Fig. 12B). A análise entre tempos indicou uma tendência de aumento progressivo nos níveis de IL-10 nos grupos modulados, embora sem significância estatística (Fig. 12C).

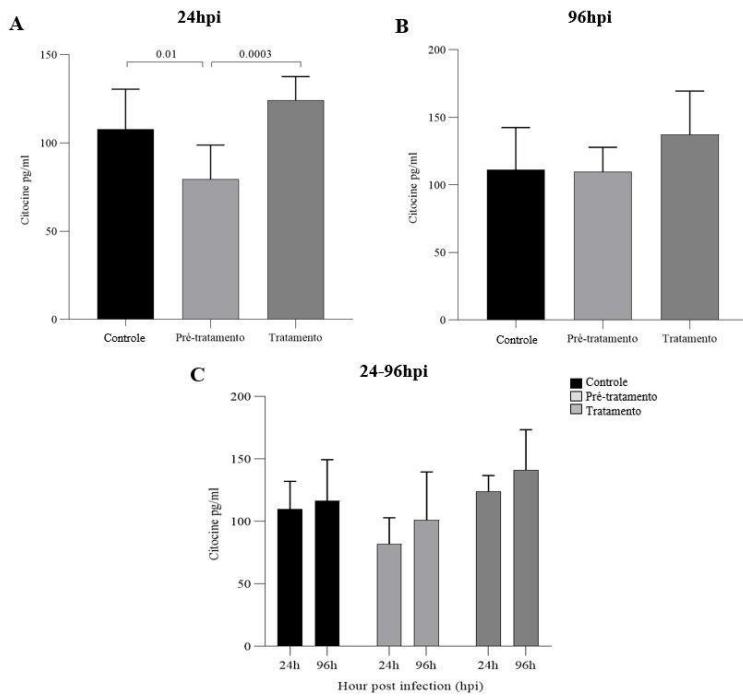


Figura 12- Produção de IL-10 em macrófagos infectados por *T. cruzi* e tratados com ciclosporina A. (A) Concentração de IL-10 aos 24 hpi em células controle, pré-tratadas e tratadas com ciclosporina A. (B) Concentração de IL-10 aos 96 hpi. (C) Comparação temporal dos níveis de IL-10 entre 24 e 96 hpi dentro de cada condição. As análises foram conduzidas por ELISA, com resultados expressos em média \pm desvio padrão; $p < 0.05$.

Por fim, a dosagem de IL-12 indicou que a ciclosporina A exerce forte efeito inibitório sobre essa citocina pró-inflamatória (Figura 13). Em 24 hpi, houve redução significativa da produção de IL-12 nos grupos pré-tratamento ($p = 0,02$) em comparação ao grupo controle, e uma redução mais significativa entre o tratamento em comparação com o pré-tratamento ($p = 0,001$) (Fig. 13A). Em 96 hpi, esse padrão se manteve, com diminuições significativas nos níveis de IL-12 tanto no grupo pré-tratado quanto no grupo tratado ($p = 0,0001$) em relação ao controle (Fig. 13B). Apesar disso, a análise temporal demonstrou um aumento significativo na produção de IL-12 entre 24 e 96 hpi em todos os grupos experimentais: controle ($p < 0,0001$), pré-tratamento ($p < 0,0001$) e tratamento ($p = 0,02$) (Fig. 13C).

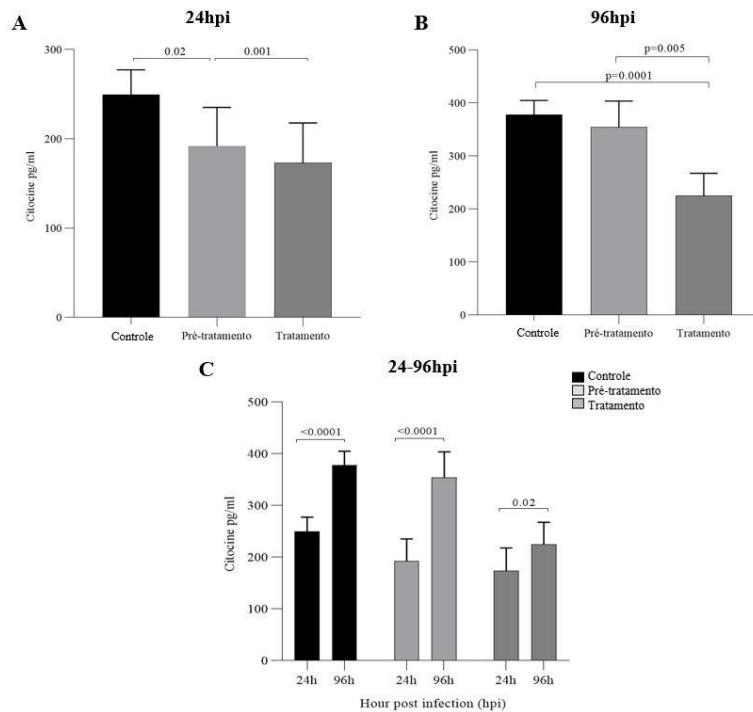


Figura 13- Efeito da ciclosporina A na produção de IL-12 por macrófagos RAW 264.7 infectados por *T. cruzi*. (A) Concentração de IL-12 em 24 hpi nas condições Controle, Pré-tratamento e Tratamento. (B) Concentração de IL-12 em 96 hpi. (C) Comparação dos níveis de IL-12 entre 24 e 96 hpi para cada grupo. A quantificação foi realizada por ELISA, com os dados expressos em pg/mL como média ± desvio padrão; $p < 0,05$.

Os resultados sugerem que a ciclosporina A modula de forma distinta as respostas pró e anti-inflamatórias em macrófagos infectados por *T. cruzi*. Enquanto IL-1 β , IL-6 e IL-12 são inibidas, especialmente quando a droga é administrada antes da infecção, a IL-10 é favorecida no tratamento pós-infecção, sugerindo um efeito imunomodulador que pode influenciar o curso da infecção e a ativação de diferentes perfis de macrófagos.

6. DISCUSSÃO

A infecção por *Trypanosoma cruzi* envolve uma complexa interação entre o parasita e as células do sistema imune inato, especialmente os macrófagos. Essas células são responsáveis pela fagocitose e destruição de patógenos intracelulares, bem como por orquestrar a resposta inflamatória através da produção de mediadores como óxido nítrico e citocinas (Machado et al. 2012). Um estudo recente demonstrou que fatores genéticos do hospedeiro exercem forte influência sobre a suscetibilidade a infecção por *T. cruzi*. Couto-Silva et al. (2023) identificaram que populações indígenas da Amazônia apresentam elevada frequência de uma variante no gene PPP3CA, associada à redução da taxa de invasão celular pelo parasita, sugerindo que essa característica foi favorecida por pressão seletiva ao longo de milhares de anos, em resposta à exposição persistente ao *T. cruzi*.

O gene PPP3CA codifica a subunidade catalítica da calcineurina, cuja atividade é inibida pela ciclosporina A (CsA), promovendo a modulação de diversas vias imunológicas (Bressan et al. 2010). Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da CsA e da inibição da PPP3CA na infecção de macrófagos RAW 264.7 pela cepa Y de *T. cruzi*, analisando taxa de invasão, multiplicação intracelular, produção de óxido nítrico e perfil de citocinas, com o intuito de elucidar os mecanismos imunomodulatórios envolvidos.

Os resultados deste estudo indicam que a ciclosporina A (CsA) apresenta efeito dependente da concentração sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 e sobre os parasitas *T. cruzi* cepa Y. Concentrações mais elevadas, 10 e 7,5 µg/mL, mostraram maior toxicidade, enquanto concentrações ≤ 5 µg/mL preservaram a viabilidade celular e parasitária, sugerindo um intervalo experimental seguro para investigação dos efeitos imunomodulatórios da droga.

A avaliação da capacidade de invasão do *T. cruzi* revelou que o pré-tratamento com CsA (0,05 µg/mL), isolado ou combinado com tratamento contínuo após a infecção, reduziu significativamente o número de células infectadas, enquanto que o tratamento pós-infecção não apresentou efeito significativo. Essa observação corrobora os achados de Couto-Silva et al. (2023), que demonstraram que populações indígenas da Amazônia apresentam alta frequência de uma variante no gene *PPP3CA*, a qual está associada à redução da taxa de invasão celular pelo *T. cruzi*. Além disso, a CsA

também impactou a multiplicação intracelular do parasita, com reduções significativas no número médio de parasitas por célula infectada em 48 e 72 horas pós-infecção. Esses achados sugerem que a CsA atua em etapas iniciais da interação parasito-hospedeiro, possivelmente modulando processos celulares críticos para a internalização e replicação do parasita, como a reorganização do citoesqueleto, a formação do fagossomo e a ativação de vias de sinalização dependentes de cálcio.

A ciclosporina A (CsA) exerce seus efeitos imunomodulatórios principalmente por inibir a fosfatase calcineurina, bloqueando a desfosforilação e a ativação de fatores de transcrição dependentes de cálcio, como fator nuclear de células T ativadas (NFAT), proteínas FOXO (FOXO), fator de transcrição EB (TFEB) e fator de potencialização de miócitos 2 (MEF2) (Creamer 2020). A inibição desses fatores impede a translocação nuclear e reduz a expressão de genes envolvidos em múltiplos processos celulares, por exemplo, o NFAT controla a expressão de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão, o FOXO regula genes associados à sobrevivência celular e ao estresse, o TFEB coordena a biogênese lisossomal e a autofagia, enquanto o MEF2 está envolvido na remodelação do citoesqueleto e na diferenciação celular (Parra and Rothermel 2016; Lapierre et al. 2015; Hoffman, Taleski, and Sontag 2017).

A internalização e a replicação do *T. cruzi* dependem da manipulação precisa da sinalização dependente de cálcio do hospedeiro. Durante a invasão, picos de cálcio intracelular induzem a reorganização do citoesqueleto, recrutamento de actina, miosina e outras proteínas motoras, além da formação de invaginações da membrana plasmática que possibilitam a internalização eficiente do parasita (Maeda, Cortez, and Yoshida 2012). Após a entrada, a manutenção ou indução de fluxos de cálcio dentro do vacúolo parasitóforo e do citosol hospedeiro contribui para a fusão adequada com endossomos e lisossomos precoces, permitindo a maturação do vacúolo e a criação de um ambiente intracelular favorável à sobrevivência e multiplicação do parasita (Romano et al. 2012).

Dessa forma, sugere-se que a ação da CsA antes da infecção pode impedir o estabelecimento adequado do *T. cruzi*, não apenas por reduzir a ativação basal de macrófagos, mas também por modular diretamente as vias intracelulares que controlam a internalização, o tráfego vesicular e a formação do ambiente vacuolar, essenciais para a sobrevivência e replicação do parasita.

Quanto à produção de óxido nítrico, foi observado no grupo tratado com CsA, uma significativa diminuição na produção de óxido nítrico (NO), um dos principais mediadores da atividade microbicida de macrófagos contra parasitas intracelulares. O

óxido nítrico é uma molécula reativa produzida principalmente por macrófagos ativados a partir da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), em resposta a sinais inflamatórios. O NO pode atuar de forma direta, promovendo danos ao DNA, proteínas e membranas dos microrganismos, ou de forma indireta, gerando espécies reativas de nitrogênio (RNS), além de participar na modulação da resposta imune, influenciando a produção de citocinas, a polarização de macrófagos e a regulação do processo inflamatório (Gutierrez et al. 2009).

Por tanto, uma vez que a produção de NO está intimamente ligada à indução da enzima iNOS, cuja expressão é regulada pelo fator nuclear kappa B (NF-κB), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e interferon gama (IFN- γ), a inibição da calcineurina ao reduzir a ativação dessas vias inflamatórias, resulta em menor produção de NO (Hämäläinen, Korhonen, and Moilanen 2009). Essa queda nos níveis de NO apresenta uma dualidade, por um lado, tende a ser benéfica ao limitar o dano inflamatório ao tecido hospedeiro, mas, por outro, compromete a capacidade efetora dos macrófagos em eliminar o parasita, favorecendo a persistência da infecção (Gutierrez et al. 2009).

No contexto do perfil de citocinas, os resultados obtidos reforçam a capacidade imunomoduladora da CsA, refletido pela supressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e IL-12. A redução desses mediadores sugere que a CsA interfere na ativação clássica dos macrófagos (perfil M1), possivelmente por meio da inibição da translocação de fatores de transcrição dependentes de cálcio, como NFAT e NF-κB, essenciais para a expressão de genes pró-inflamatórios (Xia et al. 2023; Gui, Jiang, and Zhang 2021). Esse efeito destaca a capacidade da CsA de reconfigurar a resposta inflamatória celular desde fases precoces da interação parasito–hospedeiro.

Paralelamente, observou-se aumento significativo da IL-10, citocina reguladora conhecida por promover polarização de macrófagos para um fenótipo M2 (Jiang et al. 2016). Esse perfil modulador da resposta inflamatória contribui para a redução de danos teciduais e para a manutenção de um microambiente imunológico mais equilibrado. No entanto, tal efeito pode ser simultaneamente aproveitado pelo *T. cruzi* como estratégia de evasão, uma vez que a ação da IL-10 suprime a produção de óxido nítrico e de citocinas pró-inflamatórias cruciais para o controle efetivo da infecção (Stijlemans et al. 2022). A indução de IL-10 também está associada à ativação do eixo STAT3, que contribui para a repressão de genes pró-inflamatórios e da iNOS (Hutchins, Diez, and Miranda-Saavedra 2013), o que se correlaciona com os outros achados como redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e de óxido nítrico.

A diminuição concomitante de NO e de citocinas pró-inflamatórias reforça a hipótese de que a CsA atua em múltiplos níveis, modulando tanto a sinalização intracelular quanto a produção de mediadores efetores microbicidas. A combinação desses efeitos sugere que a droga não apenas limita a ativação excessiva do macrófago, mas também ajusta a capacidade microbicida da célula, reconfigurando o equilíbrio entre mecanismos efetores e regulatórios.

Em síntese, os resultados reforçam o potencial da ciclosporina A como modulador da infecção por *Trypanosoma cruzi*, exercendo efeitos tanto sobre a capacidade do parasita de invadir e se multiplicar em macrófagos quanto sobre a resposta imune desencadeada. Entretanto, o uso de imunossupressores como a CsA em contextos infecciosos deve ser criteriosamente avaliado, considerando os riscos de favorecer a persistência parasitária e a evolução para formas crônicas da doença. A compreensão das vias moduladas pela CsA e sua relação com determinantes genéticos como o PPP3CA reforça o potencial para novas estratégias terapêuticas contra o *T. cruzi*, com maior segurança em contextos clínicos complexos.

7. CONCLUSÃO

A ciclosporina A exerce um papel modulador na interação entre macrófagos RAW 264.7 e *Trypanosoma cruzi*. O fármaco apresentou viabilidade celular preservada na concentração de 5 µg/mL e promoveu redução significativa na taxa de invasão e multiplicação do parasita, além de diminuir a produção de óxido nítrico. Concomitantemente, foi observado um perfil de citocinas alterado, com redução de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β , IL-6 e IL-12) e aumento da secreção de IL-10, sugerindo um redirecionamento da resposta imune para um estado mais regulador.

Os resultados evidenciam que a calcineurina exerce papel determinante na modulação da resposta imunológica frente à infecção por *Trypanosoma cruzi*. A via regulada por essa fosfatase mostrou-se essencial para a ativação plena dos macrófagos e para a produção coordenada de mediadores pró e anti-inflamatórios, elementos-chave no equilíbrio entre contenção da replicação parasitária e prevenção de danos exacerbados ao tecido hospedeiro.

A utilização de ciclosporina A como inibidor experimental permitiu demonstrar que esta droga interfere de maneira significativa na dinâmica da infecção por *T. cruzi*, tanto ao reduzir a invasão e a multiplicação do parasita quanto ao remodelar o perfil funcional dos macrófagos. Esse duplo efeito ressalta a importância de compreender melhor as vias reguladas pela calcineurina no contexto da doença de Chagas, contribuindo para ampliar o conhecimento sobre potenciais alvos terapêuticos. Futuras investigações poderão explorar esses mecanismos em maior profundidade, de modo a avaliar sua aplicabilidade em estratégias que conciliem controle parasitário e modulação adequada da resposta imune.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bai, Y., Zhang, T., Liu, N., Wang, C., Guo, Z., Pan, C., Zhu, H., & Lan, X. (2022). Investigation of Copy Number Variations (CNVs) of the Goat PPP3CA Gene and Their Effect on Litter Size and Semen Quality. *Animals*, 12(4), 445. <https://doi.org/10.3390/ANI12040445/S1>
- Belmino, A. C. da C., Sousa, E. K. S., Silva Filho, J. D. da, Rocha, E. A., Nunes, F. M. M., Sampaio, T. L., Evangelista, L. F., Duque, B. R., Araújo, I. C. da S., Jacó, J. I. de O., & Oliveira, M. de F. (2024). Causalidade e Gravidade das Reações Adversas e Alterações Laboratoriais ao Tratamento com Benznidazol em Pacientes com Doença de Chagas Crônica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 121(8), e20230787. <https://doi.org/10.36660/ABC.20230787>
- Bern, C. (2015). Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*, 373(5), 456–466. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA1410150>
- Bern, C., Messenger, L. A., Whitman, J. D., & Maguire, J. H. (2019). Chagas disease in the united states: A public health approach. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1). <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-19/FORMAT/EPUB>
- Brenière, S. F., Waleckx, E., & Barnabé, C. (2016). Over Six Thousand Trypanosoma cruzi Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0004792>
- Bressan, Aline Lopes, Roberto Souto Da Silva, Elisa Fontenelle, and Alexandre Carlos Gripp. 2010. “Imunossupressores Na Dermatologia.” *Anais Brasileiros de Dermatologia* 85 (1): 9–22. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000100002>.
- Callejas-Hernández, F., Gironès, N., & Fresno, M. (2018). Genome sequence of Trypanosoma cruzi strain Bug2148. *Genome Announcements*, 6(3). <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.01497-17>
- Canuto, J. A. (2016). *Efeitos da Violaceína sobre as formas evolutivas de Trypanosoma cruzi*. <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/17623>
- Chao, C., Leone, J. L., & Vigliano, C. A. (2020). Chagas disease: Historic perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(5), 165689. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2020.165689>
- Costa, M., Tavares, V., Aquino, M. V., & Moreira, D. (2013). DOENÇA DE CHAGAS: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. *Revista Eletrônica Da Faculdade Evangélica de Ceres*, 2(1). <https://doi.org/10.36607/REFACER.V2I1.3376>
- Couto-Silva, C. M., Nunes, K., Venturini, G., Silva, M. A. C., Pereira, L. V., Comas, D., Pereira, A., & Hünemeier, T. (2023). Indigenous people from Amazon show genetic signatures of pathogen-driven selection. *Science Advances*, 9(10). https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABO0234/SUPPL_FILE/SCIADV.ABO0234_TABLES_S1_TO_S5.ZIP
- Creamer, Trevor P. 2020. “Calcineurin.” *Cell Communication and Signaling : CCS* 18 (1): 137. <https://doi.org/10.1186/S12964-020-00636-4>.

- Cucunubá, Z. M., Gutiérrez-Romero, S. A., Ramírez, J.-D., Velásquez-Ortiz, N., Ceccarelli, S., Parra-Henao, G., Henao-Martínez, A. F., Rabinovich, J., Basáñez, M.-G., Nouvellet, P., & Abad-Franch, F. (2024). The epidemiology of Chagas disease in the Americas. *The Lancet Regional Health – Americas*, 37, 100881. <https://doi.org/10.1016/J.LANA.2024.100881>
- de Souza, W. (1984). Cell Biology of Trypanosoma cruzi. *International Review of Cytology*, 86(C), 197–283. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60180-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60180-1)
- de Souza, W., De Carvalho, T. M. U., & Barrias, E. S. (2010). Review on Trypanosoma cruzi: Host cell interaction. *International Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1155/2010/295394>
- Dias, J. C. P. (2015). Evolution of Chagas Disease Screening Programs and Control Programs Historical Perspective. *Global Heart*, 10(3), 193–202. <https://doi.org/10.1016/J.GHEART.2015.06.003>
- Dias, J. C. P., Ramos, A. N., Gontijo, E. D., Luquetti, A., Shikanai-Yasuda, M. A., Coura, J. R., Torres, R. M., Melo, J. R. D. C., De Almeida, E. A., De Oliveira Junior, W., Silveira, A. C., De Rezende, J. M., Pinto, F. S., Ferreira, A. W., Rassi, A., Fragata Filho, A. A., De Sousa, A. S., Correia, D., Jansen, A. M., ... Alves, R. V. (2016). 2 nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 49, 03–60. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0505-2016>
- Favaro, J., Iodice, A., Nosadini, M., Asta, F., Toldo, I., Ancona, C., Cavaliere, E., Pelizza, M. F., Casara, G., Parmeggiani, L., & Sartori, S. (2024a). PPP3CA gene-related developmental and epileptic encephalopathy: expanding the electro-clinical phenotype. *Seizure: European Journal of Epilepsy*, 121, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2024.08.017>
- Favaro, J., Iodice, A., Nosadini, M., Asta, F., Toldo, I., Ancona, C., Cavaliere, E., Pelizza, M. F., Casara, G., Parmeggiani, L., & Sartori, S. (2024b). PPP3CA gene-related developmental and epileptic encephalopathy: expanding the electro-clinical phenotype. *Seizure: European Journal of Epilepsy*, 121, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2024.08.017>
- Fernandes, P. C. C., & <http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4423433H5>. (2013). Expressão gênica dos alelos da proteína P21 na infectividade de cepas pertencentes a diferentes linhagens filogenéticas de Trypanosoma cruzi. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/16699>
- Forsyth, C. J., Hernandez, S., Olmedo, W., Abuhamidah, A., Traina, M. I., Sanchez, D. R., Soverow, J., & Meymandi, S. K. (2016). Safety Profile of Nifurtimox for Treatment of Chagas Disease in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 63(8), 1056–1062. <https://doi.org/10.1093/CID/CIW477>
- Gao, C., & Wang, Y. (2016). Positive role for a negative calcineurin regulator in cardiac hypertrophy. *Hypertension*, 67(5), 841–842. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07140/ASSET/6917B02B-8D95-4FE2-B0AC-8FE64E6336A3/ASSETS/GRAPHIC/841FIG01.JPG>
- Gonzales-Perdomo, M., Romero, P., & Goldenberg, S. (1988). Cyclic AMP and adenylyl cyclase activators stimulate Trypanosoma cruzi differentiation. *Experimental Parasitology*, 66(2), 205–212. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(88\)90092-6](https://doi.org/10.1016/0014-4894(88)90092-6)
- Gui, Qiuyi, Zhenzhou Jiang, and Luyong Zhang. 2021. “Insights into the Modulatory Role of Cyclosporine A and Its Research Advances in Acute Inflammation.” *International Immunopharmacology* 93 (April):107420. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2021.107420>.
- Gutierrez, Fredy R.S., Tiago W.P. Mineo, Wander R. Pavanelli, Paulo M.M. Guedes, and João S. Silva. 2009. “The Effects of Nitric Oxide on the Immune System during Trypanosoma Cruzi Infection.” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (SUPPL. 1): 236–45. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900030>.

- Hämäläinen, Mari, Riku Korhonen, and Eeva Moilanen. 2009. "Calcineurin Inhibitors Down-Regulate iNOS Expression by Destabilising mRNA." *International Immunopharmacology* 9 (2): 159–67. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2008.07.012>.
- Herreros-Cabello, A., Callejas-Hernández, F., Fresno, M., & Gironès, N. (2019). Comparative proteomic analysis of trypomastigotes from *Trypanosoma cruzi* strains with different pathogenicity. *Infection, Genetics and Evolution*, 76. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2019.104041>
- Herreros-Cabello, A., Callejas-Hernández, F., Gironès, N., & Fresno, M. (2020). *Trypanosoma cruzi* Genome: Organization, Multi-Gene Families, Transcription, and Biological Implications. *Genes* 2020, Vol. 11, Page 1196, 11(10), 1196. <https://doi.org/10.3390/GENES11101196>
- Hodo, C. L., Goodwin, C. C., Mayes, B. C., Mariscal, J. A., Waldrup, K. A., & Hamer, S. A. (2016). Trypanosome species, including *Trypanosoma cruzi*, in sylvatic and peridomestic bats of Texas, USA. *Acta Tropica*, 164, 259–266. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2016.09.013>
- Hoffman, Alexander, Goce Taleski, and Estelle Sontag. 2017. "The Protein Serine/Threonine Phosphatases PP2A, PP1 and Calcineurin: A Triple Threat in the Regulation of the Neuronal Cytoskeleton." *Molecular and Cellular Neuroscience* 84 (October):119–31. <https://doi.org/10.1016/J.MCN.2017.01.005>.
- Hutchins, Andrew P., Diego Diez, and Diego Miranda-Saavedra. 2013. "The IL-10/STAT3-Mediated Anti-Inflammatory Response: Recent Developments and Future Challenges." *Briefings in Functional Genomics* 12 (6): 489–98. <https://doi.org/10.1093/BFGP/ELT028>.
- Imai, Y., Ohta, E., Takeda, S., Sunamura, S., Ishibashi, M., Tamura, H., Wang, Y. hua, Deguchi, A., Tanaka, J., Maru, Y., & Motoji, T. (2016). Histone deacetylase inhibitor panobinostat induces calcineurin degradation in multiple myeloma. *JCI Insight*, 1(5), 85061. <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.85061>
- Jiang, Jianhao, Tanghong Jia, Weiming Gong, Bin Ning, Paul H. Wooley, and Shang You Yang. 2016. "Macrophage Polarization in IL-10 Treatment of Particle-Induced Inflammation and Osteolysis." *American Journal of Pathology* 186 (1): 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.09.006>.
- Kipanyula, M. J., Kimaro, W. H., & Etet, P. F. S. (2016). The Emerging Roles of the Calcineurin-Nuclear Factor of Activated T-Lymphocytes Pathway in Nervous System Functions and Diseases. *Journal of Aging Research*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5081021>
- Lannes-Vieira J, de Araújo-Jorge TC, Soeiro Mde N, Gadelha P, Corrêa-Oliveira R. The centennial of the discovery of Chagas disease: facing the current challenges. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(6):e645. Published 2010 Jun 29. doi:10.1371/journal.pntd.0000645
- Lapierre, Louis R., Caroline Kumsta, Marco Sandri, Andrea Ballabio, and Malene Hansen. 2015. "Transcriptional and Epigenetic Regulation of Autophagy in Aging." *Autophagy* 11 (6): 867. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1034410>.
- Liu, Q., Saifee, M., Yu, Y., Ying, G. S., Li, S., Zhong, H., Gedde, S. J., & Han, Y. (2020). Evaluation of Long-Term Visual Field Function in Patients Undergoing Glaucoma Drainage Device Implantation. *American Journal of Ophthalmology*, 216, 44–54. <https://doi.org/10.1016/J.AJO.2020.03.025>
- Machado, Fabiana S., Walderez O. Dutra, Lisia Esper, Kenneth J. Gollob, Mauro M. Teixeira, Stephen M. Factor, Louis M. Weiss, Fnu Nagajyothi, Herbert B. Tanowitz, and Nisha J. Garg. 2012. "Current Understanding of Immunity to *Trypanosoma cruzi* Infection and Pathogenesis of Chagas Disease." *Seminars in Immunopathology* 34 (6): 753. <https://doi.org/10.1007/S00281-012-0351-7>.

- Maeda, Fernando Y., Cristian Cortez, and Nobuko Yoshida. 2012. "Cell Signaling during *Trypanosoma Cruzi* Invasion." *Frontiers in Immunology* 3 (NOV): 361. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2012.00361>.
- Magalhães, L. M. D., Viana, A., Chiari, E., Galvão, L. M. C., Gollob, K. J., & Dutra, W. O. (2015). Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(7), e0003816. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0003816>
- Martín-Escalano, J., Marín, C., Rosales, M. J., Tsaousis, A. D., Medina-Carmona, E., & Martín-Escalano, R. (2022). An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. *ACS Infectious Diseases*, 8(6), 1107–1115. https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.2C00123/ASSET/IMAGES/LARGE/ID2C00123_0002.JPEG
- Martins-Melo, F. R., da Silveira Lima, M., Ramos, A. N., Alencar, C. H., & Heukelbach, J. (2014). Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Tropical Medicine & International Health : TM & IH*, 19(8), 943–957. <https://doi.org/10.1111/TMI.12328>
- Mineo, J. R. (2005). MEDIDAS DE BIOSSEGURANÇA EM PESQUISA NA ÁREA BIOMÉDICA. *SciiELO Books. Uberlândia*, 81–111.
- Monteiro, F. A., Weirauch, C., Felix, M., Lazoski, C., & Abad-Franch, F. (2018). Evolution, Systematics, and Biogeography of the Triatominae, Vectors of Chagas Disease. *Advances in Parasitology*, 99, 265–344. <https://doi.org/10.1016/BS.APAR.2017.12.002>
- Moreno, C. J. G., Oliveira, J. W. de F., Branco, J. C., Araújo, L., Queiroz, A. M., Donato, S. T., Júnior, N. J. da S., Rodrigues, E. T. da S., Silva, M. S., Moreno, C. J. G., Oliveira, J. W. de F., Branco, J. C., Araújo, L., Queiroz, A. M., Donato, S. T., Júnior, N. J. da S., Rodrigues, E. T. da S., & Silva, M. S. (2019). Cell Culture and Maintenance of the Evolutionary Forms of *Trypanosoma cruzi* for Studies of Parasitic Biology. *Biology of Trypanosoma Cruzi*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.84733>
- Morillo, C.A., et al. (2015). Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*, 373(14), e124–e125. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507574>
- Oliveira, A. M. de. (1986). REVISÃO DATAIXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO DO TRYpanosoma CRUZI - IMPORTÂNCIA DA GENÉTICA. *Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology*, 15(1), 13–26. <https://doi.org/10.5216/RPT.V15I1.21248>
- Oliveira, M. de F., Nagao-Dias, A. T., Oliveira De Pontes, V. M., Sales de Souza Júnior, A., Lutescia, H., Coelho, L., Castelo, I., & Coelho, B. (2008). Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. *Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology*, 37(3), 209–228. <https://doi.org/10.5216/RPT.V37I3.5063>
- Onyekwelu, K. C., & Onyekwelu, K. C. (2019). Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* in the Invertebrate and the Vertebrate Hosts. *Biology of Trypanosoma Cruzi*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.84639>
- Parra, V., & Rothermel, B. A. (2017). Calcineurin signaling in the heart: The importance of time and place. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 103, 121–136. <https://doi.org/10.1016/J.YJMCC.2016.12.006>
- Peña-Callejas, G., González, J., Jiménez-Cortés, J. G., Fuentes-Vicente, J. A. de, Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., & Flores-Villegas, A. L. (2022). Enfermedad de

- Chagas: biología y transmisión de *Trypanosoma cruzi*. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 25(0), 1–19. <https://doi.org/10.22201/FESZ.23958723E.2022.449>
- Prata, A. (1994). Chagas' disease. *Infectious Disease Clinics of North America*, 8(1), 61–76. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8021449/>
- Qian, Y., Wu, B., Lu, Y., Dong, X., Qin, Q., Zhou, W., & Wang, H. (2018). Early-onset infant epileptic encephalopathy associated with a de novo PPP3CA gene mutation. *Molecular Case Studies*, 4(6), a002949. <https://doi.org/10.1101/MCS.A002949>
- Ramírez, J. C., Torres, C., Curto, M. de los A., & Schijman, A. G. (2017). New insights into *Trypanosoma cruzi* evolution, genotyping and molecular diagnostics from satellite DNA sequence analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), e0006139. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0006139>
- Ramírez, J. D., Hernández, C., Montilla, M., Zambrano, P., Flórez, A. C., Parra, E., & Cucunubá, Z. M. (2014). First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype. *Zoonoses and Public Health*, 61(7), 477–479. <https://doi.org/10.1111/ZPH.12094>
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors 2012, Vol. 12, Pages 12347-12360*, 12(9), 12347–12360. <https://doi.org/10.3390/S120912347>
- Rassi, A., & Marin-Neto, A. (2010). Seminar Chagas disease. *Lancet*, 375, 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Rassi, A., Rassi, A., & Marcondes de Rezende, J. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), 275–291. <https://doi.org/10.1016/J.IDC.2012.03.002>
- Rodrigues Coura, J. (1999). Sítios na Internet: TRIPANOSOMOSE, DOENÇA DE CHAGAS. *Acta Tropica*, 72, 1–11.
- Romano, Patricia Silvia, Juan Agustín Cueto, Ana Florencia Casassa, Mariá Cristina Vanrell, Roberta A. Gottlieb, and Mariá Isabel Colombo. 2012. “Molecular and Cellular Mechanisms Involved in the *Trypanosoma cruzi*/Host Cell Interplay.” *IUBMB Life* 64 (5): 387. <https://doi.org/10.1002/IUB.1019>
- Salgado, P. C., Genvigir, F. D. V., Felipe, C. R., Tedesco-Silva, H., Medina-Pestana, J. O., Doi, S. Q., Hirata, M. H., & Hirata, R. D. C. (2017). Association of the PPP3CA c.249G>A variant with clinical outcomes of tacrolimus-based therapy in kidney transplant recipients. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 10, 101–106. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S131390>
- Schijman, A. G., Alonso-Padilla, J., Longhi, S. A., & Picado, A. (2022). Parasitological, serological and molecular diagnosis of acute and chronic Chagas disease: from field to laboratory. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 117(1), e200444. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200444>
- Silva, A. B. DA. (2023a). *Efeito de dissulfetos de diarila sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de Trypanosoma cruzi*. <https://repositorio.ufms.br/handle/123456789/5830>
- Silva, A. B. DA. (2023b). *Efeito de dissulfetos de diarila sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de Trypanosoma cruzi*. <https://repositorio.ufms.br/handle/123456789/5830>
- Stijlemans, Benoit, Maxime Schoovaerts, Patrick De Baetselier, Stefan Magez, and Carl De Trez. 2022. “The Role of MIF and IL-10 as Molecular Yin-Yang in the Modulation of the Host Immune Microenvironment During Infections: African Trypanosome Infections as a Paradigm.” *Frontiers in Immunology* 13 (April):865395. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.865395/XML>.

- Siqueira-Batista, R., Gomes, A. P., Rôças, G., Cotta, R. M. M., Rubião, E. C. N., & Pissinatti, A. (2011). Moléstia de Chagas e ecologia profunda: a “luta antivetorial” em questão. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16(2), 677–687. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232011000200032>
- Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2001a). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 31(5–6), 472–481. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9)
- Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2001b). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 31(5–6), 472–481. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9)
- Umezawa, E. S., Stolf, A. M. S., Corbett, C. E. P., & Shikanai-Yasuda, M. A. (2001). Chagas’ disease. *Lancet*, 357(9258), 797–799. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04174-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04174-X)
- Viotti, R., Alarcón De Noya, B., Araujo-Jorge, T., Grijalva, M. J., Guhl, F., López, M. C., Ramsey, J. M., Ribeiro, I., Schijman, A. G., Sosa-Estani, S., Torrico, F., & Gascon, J. (2014). Towards a paradigm shift in the treatment of chronic chagas disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), 635–639. [https://doi.org/10.1128/AAC.01662-13/FORMAT/EPUB](https://doi.org/10.1128/AAC.01662-13)
- Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Alvarez, M. G., Petti, M., Bertocchi, G., & Armenti, A. (2009). Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7(2), 157–163. <https://doi.org/10.1586/14787210.7.2.157>
- Wan, L., Ma, J., Xu, G., Wang, D., & Wang, N. (2014). Molecular Cloning, Structural Analysis and Tissue Expression of Protein Phosphatase 3 Catalytic Subunit Alpha Isoform (PPP3CA) Gene in Tianfu Goat Muscle. *International Journal of Molecular Sciences 2014, Vol. 15, Pages 2346-2358*, 15(2), 2346–2358. <https://doi.org/10.3390/IJMS15022346>
- WHO Worl Health Organization - *Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)*. (n.d.). Retrieved March 25, 2025, from [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- Xia, Tingting, Shengping Fu, Ruilin Yang, Kang Yang, Wei Lei, Ying Yang, Qian Zhang, et al. 2023. “Advances in the Study of Macrophage Polarization in Inflammatory Immune Skin Diseases.” *Journal of Inflammation (United Kingdom)* 20 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12950-023-00360-Z/FIGURES/2>.