



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

O papel da P21 de *Trypanosoma cruzi* na fase aguda da infecção experimental.

Júlia de Gouveia Santos

Uberlândia

Julho, 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

O papel da P21 de *Trypanosoma cruzi* na fase aguda da infecção experimental

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Claudio Vieira da Silva

Co-orientadora: MSc. Flávia Alves Martins

Júlia de Gouveia Santos

Uberlândia

Julho, 2017

Dedico esse trabalho às pessoas mais
importantes da minha vida que são meus pais,
Silvânia e José Márcio. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Eu não poderia finalizar esse trabalho sem agradecer a todos que me acompanharam e de certa forma contribuíram comigo.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer meu querido orientador Profº Dr. Claudio Vieira da Silva, por ter me aceitado como aluna e por ter me acolhido com todo carinho em seu laboratório.

Minha família, por serem meu porto seguro. Minha mãe Silvânia, meu pai José Márcio, meus irmãos, meus avós, minha bisavó e meus tios e primos queridos. Em especial à querida Elianna que é uma das responsáveis por eu estar escrevendo esses agradecimentos hoje.

Aos meus companheiros do LATRI, que com certeza fizeram os meus dias mais divertidos e enriquecedores. Aline, Bruna, Mylla, Nadjania, Patricia, Samuel, Silvany obrigada por tantos momentos de descontração no laboratório e na vida. Ao Marlus e Thaise por sempre me socorrerem quando estava perdida; Cassiano por me ouvir sempre que algo não ia bem e por me fazer companhia tantas vezes; Flávia, minha chefinha, por tanta paciência e por sua amizade (desculpa os áudios na madrugada); Paula e Rebecca por terem me introduzido no laboratório e serem as primeiras a me ensinar grande parte do que sei hoje.

Aos meus amigos da 78º Biologia que levarei sempre em meu coração, Lucas, Lara, Matheus, Leticia, Guilherme, Geovana, Phabliny, Juliana, Yasmin, Ciro, Maisa, Larissa, Natalia, Ranielly e Maristelly vocês fizeram minha graduação ser melhor que sempre imaginei que seria.

Aos meus amigos que conheci na UFU e que espero nunca deixarem de fazer parte da minha vida, Ana Clara MIB, Douglas MIB, Romário, Stefani, Stephania MIB, Thais Lobato. Obrigada pela amizade e por estarem sempre por perto!

Aos meus amigos da vida, Ana Laura, Jessica Ferreira, Kayane, Karol, Kássia, Luciano, Maria Paula, Marcus, por me fazerem tão bem, mesmo que na maioria das vezes a distancia.

Por ultimo, mas não menos importante, sou grata a Deus pela oportunidade da vida e por permitir que eu seja tão feliz!

RESUMO

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas. Este parasito possui três estágios evolutivos: epimastigota, tripomastigota e amastigota. Em 2009, uma proteína de 21kDa secretada por *T.cruzi* foi identificada e caracterizada. Sua forma recombinante (rP21), é capaz de induzir fagocitose, tem alta capacidade quimiotática, é antiangiogênica, induz a polimerização do citoesqueleto de actina, indicando a importância do seu papel no sucesso da infecção pelo parasita. Sendo assim, se torna importante aprofundar os estudos em relação a rP21 e sua atuação na infecção por *T. cruzi*, para melhor entender os mecanismos envolvidos na doença de Chagas. Com o objetivo de analisar o papel da rP21 na fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*, neste trabalho foram analisadas a viabilidade de amastigotas intracelulares quando tratadas com a rP21, produção de P21 nativa em células tratadas com a citocina IFN- γ , análises histológicas como a contagem de ninhos de amastigotas, vasos sanguíneos e quantificação de colágeno em tecido cardíaco de animais BALB/c tratados ou não com a rP21. Os resultados nos mostram que rP21, diminui a viabilidade de amastigotas intracelulares, multiplicação parasitária, assim como a deposição de colágeno tecido cardíaco em animais BALB/c. Concluímos, que a rP21 tem importante papel no controle da fase aguda na infecção experimental por *T. cruzi*, justificado pela sua atuação na polimerização do citoesqueleto de actina, mantendo os parasitas no interior celular, evitando assim o dano causado pela liberação destes no ambiente extracelular e, consequente ativação do sistema imune.

Palavras chave: *Trypanosoma cruzi*; rP21; Doença de Chagas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Análise da viabilidade dos amastigotas intracelulares	8
FIGURA 2 - Análise da produção de P21 por células infectadas com T. cruzi da cepa Y	9
FIGURA 3 - Parasitemia dos animais	9
FIGURA 4 - Contagem de vasos sanguíneos.....	10
FIGURA 5 - Ninhos de amastigotas.....	11
FIGURA 6 - Análise da área de fibrose no tecido cardíaco	12

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Microgramas
CXCR4	Receptor de quimiocina CXC tipo 4
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium (Meio Eagle modificado por Dulbecco)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
kDa	Quilo Dalton
LIT	Infusão de fígado e triptose
mL	Mililitros
NO	Óxido Nítrico
°C	Graus Celsius
PBS	Tampão fosfato-salino pH 7,2
PGN	Solução contendo PBS, 0,15% de gelatina e 0,1% azida (NaN ₃)
PGN-Sap	Solução contendo PGN + 0,1% saponina
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TCT	Tripomastigotas de cultura de tecidos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2 A P21 DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
2.0 JUSTIFICATIVA	3
3. OBJETIVO GERAL	4
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
4. MATERIAL E MÉTODOS	5
4.1 CULTURA DE CÉLULAS	5
4.2 CULTURA DE PARASITOS DE CÉLULAS	5
4.3 PURIFICAÇÃO DA RP21	5
4.4 ANÁLISE DA VIABILIDADE DOS AMASTIGOTAS INTRACELULARES	6
4.5 ANÁLISE POR ELISA DA PRODUÇÃO DE P21	6
4.6 ANÁLISE <i>IN VIVO</i> DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM RP21 NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
4.7 NORMAS DE BIOSSEGURANÇA	7
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	7
5. RESULTADOS	7
5.1 ANÁLISE DA VIABILIDADE DOS AMASTIGOTAS INTRACELULARES	7
5.2 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE P21 POR CÉLULAS INFECTADAS COM <i>T. cruzi</i> DA CEPA Y	9
5.3 PARASITEMIA DOS ANIMAIS	9
5.4 CONTAGEM DE VASOS	10
5.5 NINHOS	11
5.6 QUANTIFICAÇÃO DE FIBROSE NO CORAÇÃO	12
6.0 DISCUSSÃO	13
7.0 CONCLUSÃO	14
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Trypanosoma cruzi pertence à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e caracteriza-se morfollogicamente por apresentar três estágios evolutivos distintos: epimastigota, tripomastigota e amastigota. O desenvolvimento de um estágio a outro é um processo complexo, envolvendo mudanças ultraestruturais, antigênicas e fisiológicas (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984).

O ciclo biológico de *T. cruzi* é heteroxênico, envolvendo um hospedeiro vertebrado (mamíferos de várias espécies, incluindo o homem) e um invertebrado (vetor), representado por insetos hemípteros da Família Reduviidae, cujos gêneros de maior importância são *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (BARRETO, 1979). O início do ciclo pode ocorrer quando o inseto triatomíneo ingere formas tripomastigotas juntamente com o sangue de um hospedeiro portador de *T. cruzi*. Estes parasitas passam então para o intestino médio do vetor, multiplicam-se como epimastigotas e no decorrer de algumas semanas migram para o intestino posterior, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (VIANNA, 1911).

Ao picarem um novo vertebrado, os insetos defecam, depositando suas fezes e urina com parasitas sobre a pele ou mucosas do hospedeiro. A penetração destes no organismo pode se dar diretamente nas mucosas ou quando o indivíduo coça o local da picada, provocando uma lesão tecidual. A partir daí, os tripomastigotas metacíclicos podem invadir uma variedade de tipos celulares, onde se diferenciam em amastigotas, que começam a se multiplicar após um período de 20 a 30 horas (VIANNA, 1911).

No final da fase de multiplicação, quando a célula está abarrotada de parasitas, os amastigotas diferenciam-se novamente em tripomastigotas, que escapam das células hospedeiras para os espaços intercelulares ou ganham a circulação. Estes tripomastigotas, chamados tripomastigotas sanguíneos, podem então invadir novos macrófagos ou células de outros tecidos e órgãos do hospedeiro, ou serem ingeridos pelo inseto durante seu repasto sanguíneo. A descrição do ciclo de *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado foi realizada por Gaspar Vianna (VIANNA, 1911) ao analisar a necropsia de uma criança que havia morrido na fase aguda da doença de Chagas.

Durante muitas décadas, a doença de Chagas foi uma doença estritamente rural. No entanto, as mudanças socioeconômicas, o êxodo rural, o desmatamento e a urbanização transformaram o perfil epidemiológico da doença, tornando-a um fenômeno mais

urbano / periurbano. (WHO, 2017). No ciclo silvestre, parece haver um balanço ecológico entre o parasita, seus vetores e hospedeiros (BARRETO, 1979), enquanto que o ciclo doméstico resulta do contato entre o homem e o vetor, provocado por modificações ecológicas e sociais no ambiente (DIAS, 1987).

A infecção por *T. cruzi* possui apresentação clínica variável. A fase aguda inicial dura cerca de 2 meses após a infecção. Durante a fase aguda, grande número de parasitas circula no sangue, mas na maioria dos casos os sintomas estão ausentes ou leves e inespecíficos (WHO, 2017). Neste período, as formas amastigotas podem ser vistas no interior de fibras cardíacas, células musculares lisas e esqueléticas, células endoteliais, gliais, macrófagos e fibroblastos (TORRES, 1917).

Durante a fase crônica, os parasitas estão escondidos principalmente nos músculos cardíaco e digestivo. Até 30% dos pacientes sofrem de distúrbios cardíacos e até 10% sofrem de distúrbios digestivos (geralmente aumento do esôfago ou cólon), alterações neurológicas. Em anos posteriores, a infecção pode levar à morte súbita devido a arritmias cardíacas ou insuficiência cardíaca progressiva causada pela destruição do músculo cardíaco e do sistema nervoso (WHO, 2017).

1.2 A P21 de *Trypanosoma cruzi*

Em 2009, Silva e colaboradores identificam uma proteína de 21 kDa secretada por todas as formas evolutivas de *T. cruzi*, a P21, que está envolvida no processo de invasão celular por amastigotas e tripomastigotas metacíclicos. A sua forma recombinante (rP21), adere à superfície de células HeLa de maneira dose-dependente. Quando utilizado anticorpos policlonais que se ligam à rP21, há inibição da invasão celular por amastigotas e tripomastigotas metacíclicos *in vitro*, enquanto que a utilização da proteína recombinante ao mesmo tempo que a incubação dessas formas do parasita, aumenta a invasão celular em células HeLa (SILVA et al., 2009).

Trabalhos recentes executados com a rP21, mostrou que a rP21 é uma proteína capaz de induzir fagocitose através da ligação ao receptor de quimiocinas CXCR4, ativação da via PI3-quinase, local em que se dá a indução da polimerização do citoesqueleto de actina da célula. Esse mesmo estudo identificou alta atividade quimiotática da rP21, *in vitro* e *in vivo*. Esses resultados indicam que esta proteína tem um papel importante na evasão do parasita frente à resposta imunológica do hospedeiro (RODRIGUES et al., 2012).

Quando se infecta patas de camundongos BALB/c com *Leishmania amazonensis* e logo após trata com rP21, é visto aumento da carga parasitária comparado com o grupo controle, além de aumento da inflamação local supostamente pelo recrutamento de células fagocíticas, uma vez que essas células são as principais hospedeiras de *L. amazonensis* (TEIXEIRA, 2014). E ainda, a rP21 intensifica o recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, comprovando o efeito quimiotático da proteína, através da sua ligação ao receptor CXCR4. Foi observado também, uma alteração no perfil das células inflamatórias recrutadas, mudando de polimorfonucleares para macrófagos e linfócitos durante o tratamento. Indicando um perfil de recrutamento similar ao que se dá ao longo de processos infecciosos no organismo (MACHADO, 2014). Esse trabalho tem como objetivo observar como a rP21 atua na fase aguda da Doença de Chagas, em camundongos BALB/c e, e a possível atuação no controle da doença na fase aguda.

2.0 Justificativa

Estima-se que 8 milhões de pessoas estejam infectadas com *Trypanosoma cruzi* em todo o mundo, principalmente na América Latina, onde a doença de Chagas continua a ser um dos maiores problemas de saúde pública, causando incapacidade em indivíduos infectados e mais de 10 000 óbitos por ano. Nas últimas décadas, a infecção foi cada vez mais detectada em países onde a doença de Chagas não é endêmica. A presença da doença de Chagas fora da América Latina deve-se à mobilidade da população, principalmente migração, mas casos de infecção foram relatados entre os viajantes que retornam da América Latina. A transmissão também pode ocorrer por transfusão de sangue, meios congênitos e rotas de transplante (WHO, 2017).

Não existe ainda, medicamento eficaz no tratamento da Doença de Chagas que não apresente efeitos colaterais. Então, têm sido analisados medicamentos existentes no mercado para outras finalidades, na tentativa de encontrar uma droga a qual consiga eliminar os parasitas de doenças tropicais negligenciadas, como a Doença de Chagas, visando a obtenção de mínimos efeitos colaterais (SIQUEIRA-NETO et al., 2012).

Considera-se que a proteína P21 tem importante papel na evasão do parasita e na fase crônica da doença de Chagas, em indivíduos infectados pelo parasita. Esse atributo seria resultado da sua propriedade pró-fagocítica e sua *função* na permanência do parasita na célula. Além disso, a rP21 atua na indução da polimerização de actina em modelos celulares, através de sua ligação ao receptor CXCR4, sugerindo que esta proteína também pode se ligar a proteínas regulatórias do citoesqueleto no citoplasma da célula hospedeira. E a maior polimerização do citoesqueleto de actina pode estar associado com a passagem da fase aguda para a fase crônica da doença de Chagas, pois o parasita fica dentro da célula hospedeira, diminuindo sua multiplicação, através do bloqueio físico criado pela quantidade maior de filamentos de actina.

Além das atribuições durante a infecção parasitária, a rP21 tem a capacidade de indução à quimiotaxia em neutrófilos, macrófagos e linfócitos, sendo eficaz no aumento da taxa de inflamação local. Analisamos nesse trabalho seu papel na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*.

3. Objetivo Geral

Estudar o papel da P21 recombinante baseada na proteína nativa de *T. cruzi* na fase aguda da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*.

3.1 Objetivos específicos

- Dosar a produção da P21 nas células C2C12 e MΦ peritoneais infectadas;
- Analisar o efeito da rP21 na viabilidade de amastigotas intracelulares
- Analisar o efeito da rP21 na infecção por *Trypanosoma cruzi*, observando a parasitemia, em camundongos BALB/c.
- Examinar a ação da rP21 na formação de vasos, em camundongos BALB/c infectados por *Trypanosoma cruzi*.
- Investigar a atuação da rP21, na quantidade de ninhos de amastigotas encontrados no tecido cardíaco de camundongos BALB/c infectados por *Trypanosoma cruzi*.
- Examinar a ação da rP21, na deposição de colágeno no tecido cardíaco de camundongos BALB/c infectados por *Trypanosoma cruzi*.

4. Material e Métodos

4.1 Cultura de células

Foram utilizadas células Vero obtidas a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), para manutenção do ciclo de *Trypanosoma cruzi in vitro*. Além disso, também foram utilizados macrófagos peritoneais inflamatórios, retirados de camundongos C57BL/6, após 72 horas de estímulo com solução de tioglicolato 3%; mioblasto C2C12, os quais foram adquiridos a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Para cultivo de todas as células foi utilizado *Dulbecco's modified Eagle's medium*-DMEM (Vitrocell/Embriolife), com L-glutamina (2mM) e D-glicose (4500 mg/L), bicarbonato de sódio (2000 mg/L), HEPES (2380 mg/L), piruvato de sódio (1100 mg/L), suplementado com os antibióticos penicilina (60 mg/L), gentamicina (40 mg/L) e estreptomicina (10 mg/L), e com soro fetal bovino-SFB (Vitrocell/Embriolife) a 10%. As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

4.2 Cultura de parasitos de células

Formas tripomastigotas e amastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram mantidas em células Vero, com meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Os parasitas foram periodicamente inoculados em camundongos para manter a infectividade. Formas epimastigotas foram obtidas por meio da incubação de tripomastigotas em meio LIT pH 7,2 por 18 horas. Os repiques de epimastigotas foram feitos duas vezes por semana para crescimento e manutenção dos mesmos.

4.3 Purificação da rP21

A purificação da proteína recombinante P21, foi realizada conforme descrito previamente por SILVA et al., (2009). A rentabilidade e a qualidade da purificação foram testadas por *Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis* (SDS – Page).

4.4 Análise da viabilidade dos amastigotas intracelulares

Macrófagos peritoneais e mioblastos C2C12 foram plaqueados em placas de 6 poços, onde os macrófagos foram semeados na quantidade de 1×10^6 /poço e as células C2C12 na quantidade de 2×10^5 /poço, e deixadas *overnight* para melhor adesão.

No outro dia, as células foram infectadas por formas tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) da cepa Y de *T. cruzi*, na quantidade de dez parasitos/célula. Após 3 horas, os poços foram lavados três vezes com PBS e foi repostado o meio de cultura contendo ou não a citocina IFN- γ na concentração de 10 ng/ml.

Após 96h, os poços foram lavados três vezes com PBS 1x e as células desaderidas com a utilização de *cell scraper*. Para lise das células e recuperação dos amastigotas intracelulares, foram utilizadas seringas de insulina, acopladas a agulhas de 4,0 mm de comprimento x 0,23 mm de largura. Os amastigotas recuperados foram analisados quanto a sua viabilidade pela análise da capacidade desses amastigotas se diferenciarem em epimastigotas e se replicarem. Para isso, os amastigotas recuperados foram colocados em meio LIT pH 7,2 e após 10 dias, houve a contagem dos epimastigotas resultantes da diferenciação em câmara de Neubauer.

4.5 Análise por ELISA da produção de P21

Macrófagos peritoneais e mioblastos C2C12 foram plaqueados e infectados conforme descrito anteriormente (item 4.4), após 96h as células foram mantidas em gelo e lisadas com auxílio do tampão RIPA (Sigma- Aldrich). Foram realizados ELISAs utilizando kit caseiro para dosagem da P21 nas amostras.

4.6 Análise *in vivo* dos efeitos do tratamento com rP21 na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*

Animais BALB/c, machos de seis a dez semanas, mantidos no CBEA/UFU, foram infectados em tecido subcutâneo com 10^6 tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) da cepa Y. Os animais foram infectados os TCTs da cepa Y e tratamento ocorreu nos dias 0,5 e 15 dias pós-infecção com a rP21. O protocolo de tratamento utilizou 100 μ g de rP21/animal, a qual foi inoculada na região subcutânea. Os grupos foram compostos de 6 animais. Os controles foram: a) animais não infectados e tratados com PBS; b) animais não infectados e tratados com rP21; c) animais infectados e tratados com PBS.

Realizou-se a parasitemia sanguínea de dois em dois dias, onde foram contabilizados o total de tripomastigotas sanguíneos presentes em 5µL de sangue, por meio da análise por microscopia óptica. No 20º dia de infecção, os animais foram sacrificados e os corações foram coletados.

No coração foram realizadas diferentes análises histológicas. Dentre as análises histológicas, foi realizada a avaliação de fibrose, contagem de vasos e de números de ninhos. Para isso, os órgãos retirados dos animais foram fixados em formaldeído tamponado a 10% e incluídos em parafina. Para avaliação do reparo tecidual, as lâminas foram coradas com picrossirius para quantificação de colágeno. Para avaliação de número de vasos e de ninhos, foi realizada coloração com hematoxilina e eosina. Foram contados 25 campos por órgão. Todas as imagens foram analisadas usando o *software ImageJ*.

4.7 Normas de biossegurança

Todos os procedimentos que foram realizados neste estudo, bem como a utilização de equipamentos, seguiram as normas de biossegurança descritas por Mineo et al. (2005).

4.8 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata. A significância dos experimentos foi determinada pelo método ANOVA ou seu correspondente não paramétrico, com pós-teste Bonferroni (ou Tukey), pelo GraphPadPrism (©2015 GraphPad Software, Inc.) versão 6.01. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Análise da viabilidade dos amastigotas intracelulares

Os amastigotas intracelulares recuperados de células C2C12 e macrófagos peritoneais foram analisados quanto a sua viabilidade pela análise da capacidade desses amastigotas se diferenciarem em epimastigotas e se replicarem. Os amastigotas recuperados foram colocados em LIT pH 7,2 por 10 dias e então foram contados utilizando uma câmara de Neubauer. A citocina IFN- γ , reduziu o número de

amastigotas viáveis em C2C12 (Figura 1-A) e macrófagos peritoneais (Figura 1-B). Já a rP21 reduziu a viabilidade de amastigotas em macrófagos peritoneais (Figura 1-B).

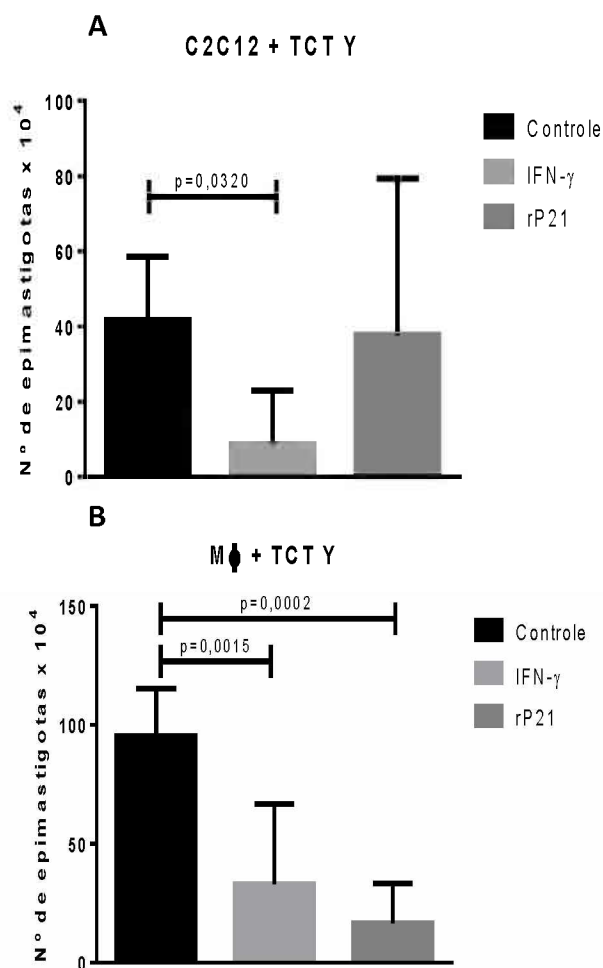


FIGURA 1- Análise da viabilidade dos amastigotas intracelulares: (A) Células C2C12 foram infectadas e tratadas com IFN- γ (10ng/ml) e rP21 (40 μ g/ml) e os amastigotas intracelulares foram recuperados e diferenciados em epimastigotas, os epimastigotas foram contados utilizando câmara de Neubauer. O tratamento com IFN- γ reduziu a viabilidade dos amastigotas. (B) Macrófagos peritoneais foram infectados e tratados com IFN- γ (10ng/ml) e rP21 (40 μ g/ml) e quando recuperados os amastigotas intracelulares, os epimastigotas foram contados utilizando câmara de Neubauer. Foi possível verificar diminuição da viabilidade de amastigotas em ambos os tratamentos.

5.2 Análise da produção de P21 por células infectadas com *T. cruzi* da cepa Y

Com a intenção de analisar a atuação da citocina INF- γ , a qual causa ativação da célula e consequentemente um ambiente intracelular inóspito ao parasita, na produção de P21 por *T. cruzi*, C2C12 e macrófagos peritoneais foram infectados e tratados com INF- γ (10ng/ml). Foi possível verificar que em células C2C12 infectadas, a citocina aumenta a produção de P21 por *T. cruzi*.

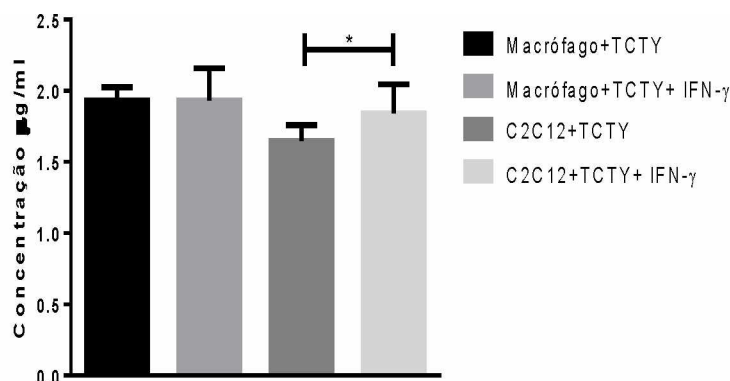


FIGURA 2 - Análise da produção de P21 por células infectadas com *T. cruzi* da cepa Y: ELISA para detecção de P21 nativa, realizado com extratos de células C2C12 e macrófagos peritoneais com 96 horas de infecção por *T. cruzi* da cepa Y. Pode ser observado o aumento da produção de P21 em C2C12 infectadas com TCT Y e tratadas com IFN- γ .

5.3 Parasitemia dos animais

A fim de observar a atuação da rP21 na fase aguda da infecção por *T. cruzi* em animais BALB/c, foram realizadas parasitemias, as quais consistiram na contagem de tripomastigotas sanguíneos em microscópio óptico, de dois em dois dias.

Como podemos observar na figura 3, o pico máximo de parasitos, ocorreu no 8º dia de infecção. Observa-se que até o décimo terceiro dia (13º) de infecção há maior número de parasitas na corrente sanguínea, no grupo tratado com rP21, sendo que após o décimo quinto dia (15º), foram encontrados maior número de parasitas no sangue de animais tratados com PBS.

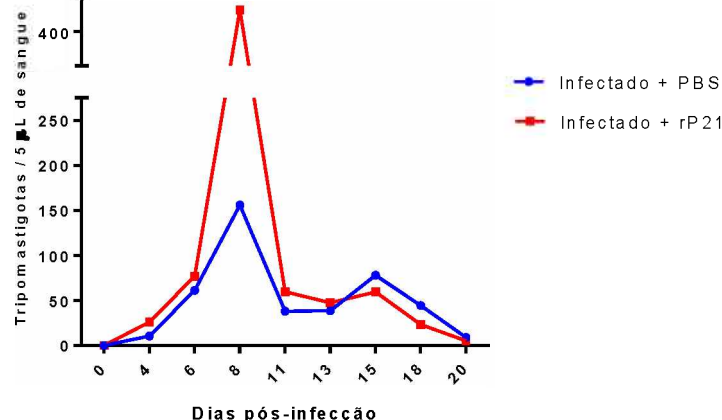


FIGURA 3 - Parasitemia dos animais: Contagem de parasitas em lâminas com 5 μ L de sangue. Quando os animais foram infectados e tratados com P21, observamos maior quantidade de parasitas na corrente sanguínea até o 13º dia de infecção. A partir do 15º dia observamos maior quantidade de parasitas no sangue dos animais infectados e tratados com PBS. Pico da parasitemia foi observado no 8º dia de infecção.

5.4 Contagem de Vasos sanguíneos

Sabendo que a rP21 é capaz de inibir a angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos, e com intuito de analisar o efeito da rP21 na angiogênese em infecção experimental. Na figura 4-A é possível observar a quantidade de vasos/mm² no tecido cardíaco em animais tratados ou não com a proteína recombinante, apontando menor quantidade de vasos em animais tratados com a rP21. Quando em animais infectados, observa-se maior numero de vasos quando realizado o tratamento com a rP21. (B) Não infectado e tratado com PBS. (C) Não infectado e tratado com rP21. (D) Infectado e tratado com PBS. (E) Infectado e tratado com rP21. Setas em verde e azul apontando vasos.

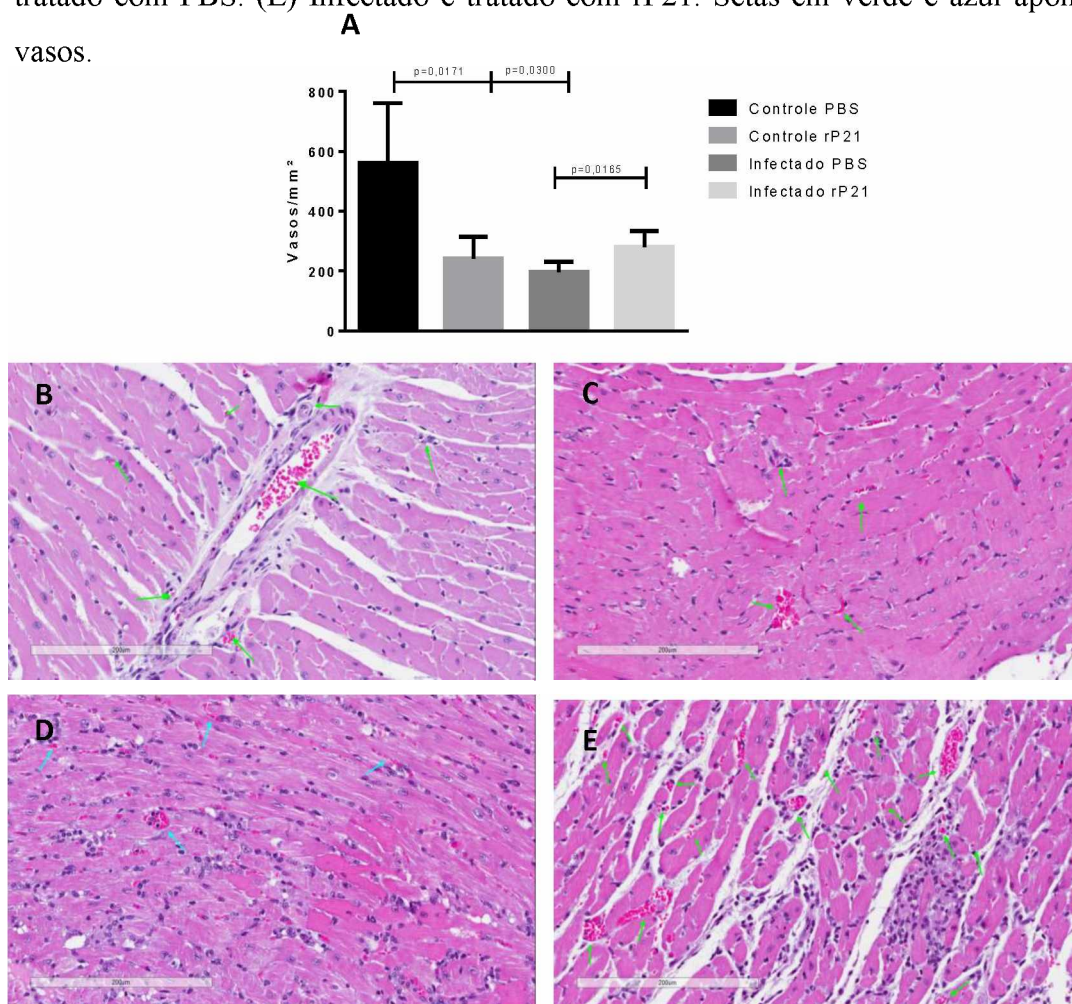


FIGURA 4 - Contagem de vasos sanguíneos: (A) Número de vasos por mm². Diferença estatística significativa entre os grupos não infectados - PBS e não infectado - rP21, indicando menor quantidade de vasos em animais tratados com a rP21. Quando em animais infectados, observa-se maior numero de vasos quando realizado o tratamento com a rP21. (B) Não infectado e tratado com PBS. (C) Não infectado e tratado com rP21. (D) Infectado e tratado com PBS. (E) Infectado e tratado com rP21. Setas em verde e azul apontando vasos. As imagens foram obtidas através do Software ImageScope, foram aumentadas em 20x.

5.5 Ninhos de amastigotas

Com o intuito de analisar a atuação da rP21 no controle da infecção, através da capacidade de polimerizar o citoesqueleto de actina. Foram contados o número de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco de animais tratados ou não com a rP21. Na figura 4-a, observa-se menor quantidade de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco nos animais que foram tratados com a rP21. Na figura 4-b, é possível observar os ninhos de amastigotas no tecido cardíaco de animais tratados com PBS e na figura 4-c, observa-se ninhos de amastigotas no tecido cardíaco de animais tratados com a rP21.

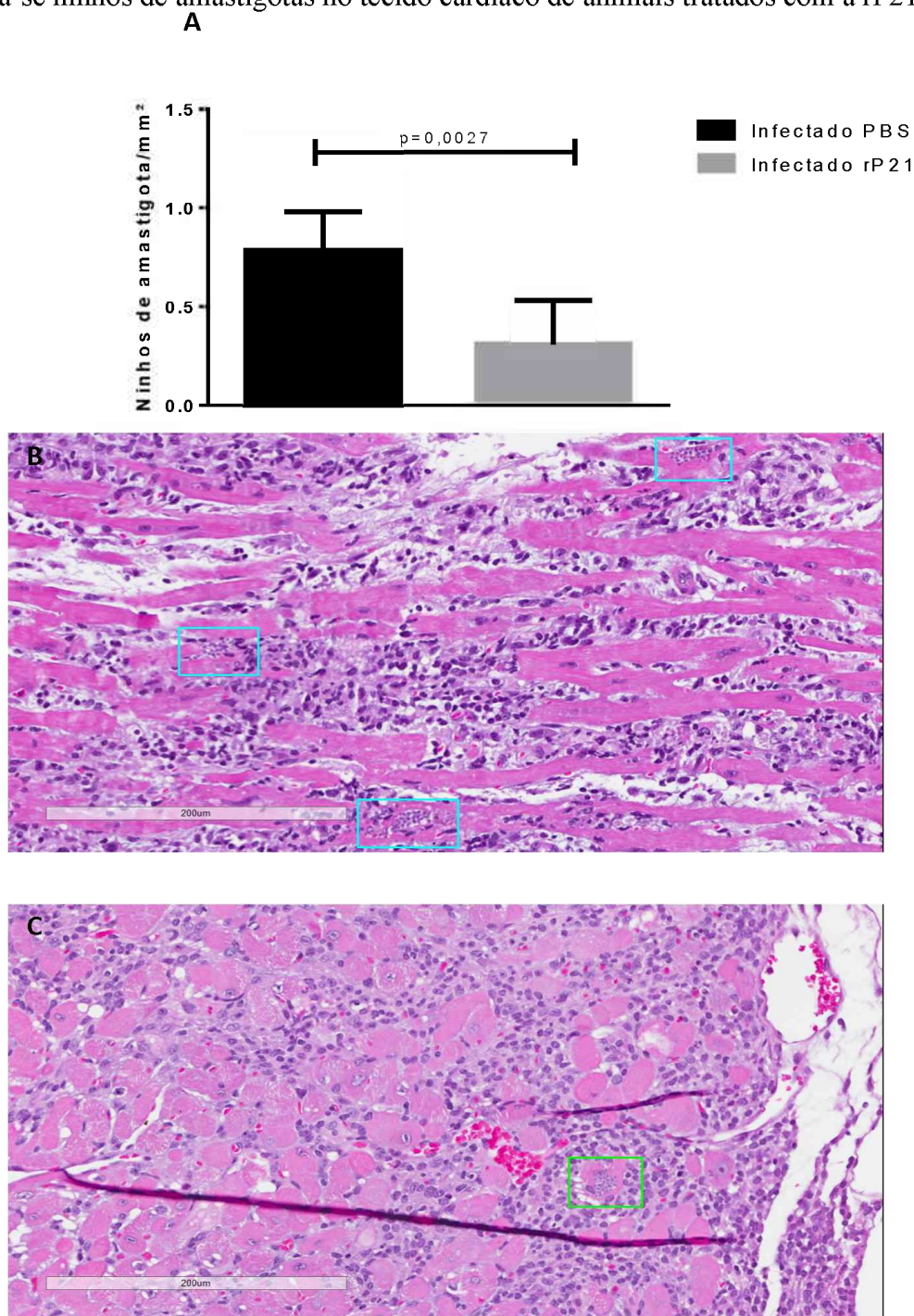


FIGURA 5 - Ninhos de amastigotas: Quantificação de ninhos de amastigotas por mm². Há diferença estatística significativa entre os grupos infectados, tratados ou não com rP21, indicando menor quantidade de ninhos de amastigotas quando tratados com rP21. (A) Infectado e tratado com PBS (ninhos em quadrados azuis). (B) Infectado e tratado com rP21 (ninho em quadrado verde).

5.6 Quantificação de fibrose no coração

A fim de analisar a atuação da rP21 na reparação tecidual em infecção experimental por *T. cruzi*, foi quantificado a área total de deposição de colágeno no tecido cardíaco de animais infectados ou não e tratados ou não com a rP21. Na figura 5-A, observa-se menor área de fibrose em animais infectados e tratados com a rP21. Na figura 5-, tecido cardíaco de animal não infectado e tratado com PBS; figura 5-C, tecido cardíaco de animal infectado e tratado com PBS. Observa-se grande área de tecido com fibrose; Figura 5-D, tecido cardíaco de animal não infectado e tratado com rP21; Figura 5-E, tecido cardíaco de animal infectado e tratado com rP21.

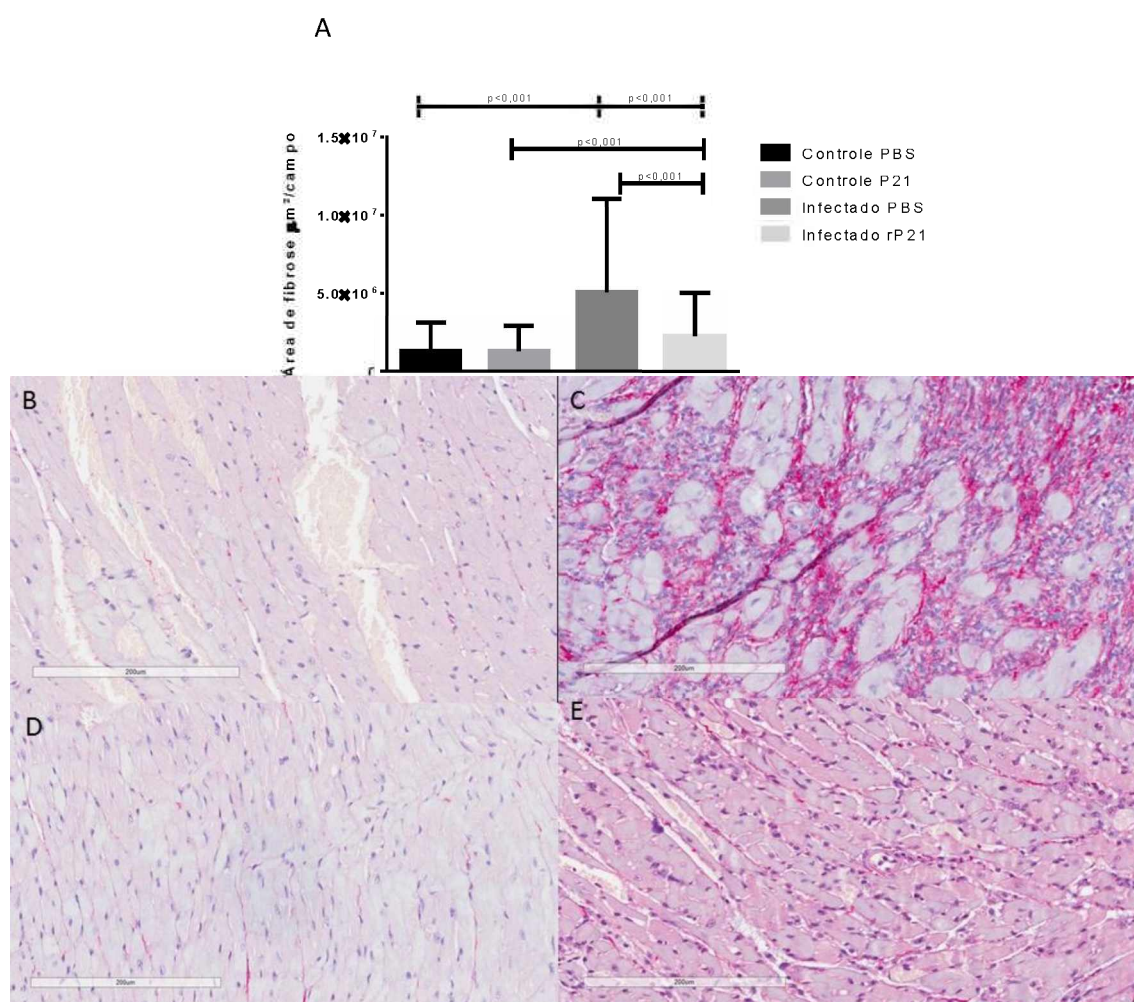


FIGURA 6 - Análise da área de fibrose no tecido cardíaco: (A) Observamos que os dois grupos infectados (PBS e rP21 Infectado), apresentaram maior área de fibrose. O grupo infectado - PBS apresentou maior fibrose quando comparado ao grupo infectado - rP21. (B) Grupo não infectado e tratado com PBS; (C) Infectado e tratado com PBS; (D) Não infectado e tratado com rP21; (E) Infectado e tratado com rP21.

6.0 Discussão

6.1 Multiplicação parasitária

Estudos anteriores, em que foram feitos tratamentos com a rP21 em mioblastos mostraram que houve uma diminuição significativa da multiplicação de *T. cruzi* da cepa G dentro das células (MARTINS, 2013). Isso corrobora com os experimentos de viabilidade realizados neste trabalho, em que a rP21 diminuiu o número de amastigotas intracelulares da cepa Y viáveis recuperados de macrófagos peritoneais após 96h, e o número de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco em animais tratados com a mesma. A citocina IFN- γ , mostra diminuição de amastigotas intracelulares recuperados também em macrófagos peritoneais e mioblasto C2C12.

O fato da multiplicação dos parasitas ter diminuído com os tratamentos realizados com IFN- γ e rP21, pode ser devido à capacidade destas em aumentar a polimerização do citoesqueleto de actina nas células. Conforme o parasita se multiplica, ocorre um afrouxamento do citoesqueleto de actina, culminando na despolimerização e o resultado é a multiplicação dos parasitas sem que haja barreiras físicas (MOTT et al., 2009). Assim, a formação de uma barreira física com o citoesqueleto de actina poderia atuar no impedimento da multiplicação intracelular do parasita.

Outra explicação para o tratamento com IFN- γ e a rP21 diminuírem a multiplicação dos parasitas, pode ser devido ao fato desses tratamentos induzirem a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio nas células (MARTINS, 2015), que atuam como mediadores na eliminação de patógenos e são sabidamente ativados por IFN- γ (BOGDAN, 2001). Além disso, foi observada *in vivo* a diminuição de ninhos de amastigotas em tecido cardíaco de camundongos BALB/C, quando infectados e tratados com rP21, mostrando mais uma vez que rP21 possui papel significativo no controle da infecção por *T. cruzi*. Nesse estudo, a citocina IFN- γ mostrou-se capaz de aumentar a produção de P21 nativa em células C2C12.

6.2 Angiogênese

O desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de outros vasos é chamado de angiogênese e tem importante função nos processos patológicos e

fisiológicos (POTENTE et al., 2011). A angiogênese pode ser inibida de várias maneiras, como regulação negativa de fatores de crescimento, interação direta de uma proteína com células endoteliais interferindo com integrinas, degradação de componentes da matriz extracelular (AVRAAMIDES et al., 2008).

De acordo com a literatura, a rP21 tem capacidade elevada de inibir angiogênese e tal inibição regulada pela rP21 é realizada por uma interação direta com as células endoteliais via receptor CXCR4 (TEIXEIRA et al., 2017). Nesse estudo, a rP21 inibiu a formação de vasos, quando não infectados. Curiosamente, quando infectados e tratados com a rP21 houve maior número de vasos em relação aos animais tratados com PBS. Resultado que pode ser explicado pela menor área fibrose no tecido cardíaco quando realizado o tratamento com a rP21. Havendo menos tecido danificado pela infecção, inferimos que se tem menor reparação tecidual e, conseqüentemente, menor deposição de colágeno total no órgão.

7.0 Conclusão

Nesse estudo observamos que a rP21 reduz danos causados pela infecção de *T. cruzi* no tecido cardíaco em animais BALB/c, justificado pela sua atuação no aumento da polimerização do citoesqueleto de actina, mantendo os parasitas dentro da célula, evitando assim o dano causado pela eclosão desses. Além disso, demonstramos que a rP21 tem importante papel no controle da infecção experimental por *T. cruzi*, uma vez que diminui também a viabilidade de amastigotas intracelulares e a multiplicação parasitária e o número de ninhos de amastigotas.

8.0 Referências Bibliográficas

- AVRAAMIDES, C.J.; GARMY- SUSINI, B.; VARNER, J.A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, p.604-617, 2008.
- BARRETO, M. P. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. (Brenner, Z., Andrade, Z. A. Eds.) Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 89 -151, 1979.
- BORGES, B. C. Caracterização das atividades biológicas da proteína recombinante P21 de *Trypanosoma cruzi* sobre linhagem celular tumoral de mama *in vitro*. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. UFU. Uberlândia, 2015.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu.Rev. Microbiol**, v.27, p. 347 – 382, 1973.
- DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Rev. Cell Biol**, v.86, p. 197 – 283, 1984.
- DIAS, J.C.P. Control of Chagas disease in Brazil. **Parasitology Today**, v.3, p. 336-341, 1987.
- MACHADO, F. C. Galectina-3, AFAP1-L1 e WASP na invasão e multiplicação de *Trypanosoma cruzi* e caracterização biológica da proteína P21-His₆. **Dissertação (Mestrado)** - Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 65f. 2014.
- MARTINS, F.A. Citocinas, citoesqueleto de actina e a P21 de *Trypanosoma cruzi* na multiplicação intracelular do parasito *in vitro*. **Dissertação (Mestrado)** – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 80f. 2015.
- MARTINS, F.A. Estudos biológicos da P21 de *Trypanosoma cruzi* e seu efeito na multiplicação parasitária. **Monografia (Graduação)**. Instituto de Biologia – Curso de Ciências Biológicas, modalidade Bacharelado. 52f, 2013
- MOTT, A. et al. Modulation of Host Cell Mechanics by *Trypanosoma Cruzi*. **J. Cell. Physiol.** v. 218, p. 315–322, 2009.
- POTENTE, M.; GERHARDT, H.; CARMELIET, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. **Cell**, v. 146, p. 873-887, 2011.

RODRIGUES, A. A. et al. A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis, **Plos One**, v. 7, n. 12, 2012b.

SAOSA, J. S. S.; SILVA, G. K., et al. IFN- γ Plays a Unique Role in Protection against Low Virulent *Trypanosoma cruzi* Strain, **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 6, n. 4, April 2012.

SILVA, C. V.; KAWASHITA, S. Y.; PROBST, C. M., et al. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 563-570, April 2009.

SIQUEIRA-NETO, J. L.; MOON, S.; JANG, J., et al. An Image-Based High-Content Screening Assay for Compounds Targeting Intracellular *Leishmania donovani* Amastigotes in Human Macrophages. **Plos neglected tropical diseases**, v.6, p. e1671, June 2012.

TEIXEIRA, S. C. et al. Mechanistic Insights into the Anti-angiogenic Activity of *Trypanosoma cruzi* Protein 21 and its Potential Impact on the Onset of Chagasic Cardiomyopathy. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

TEIXEIRA, T. L. Proteínas relacionadas ao citoesqueleto e vias de sinalização envolvidas no tráfego intracelular de *Leishmania amazonensis*: efeito da proteína P21-His6 de *Trypanosoma cruzi* em infecção por *Leishmania amazonensis* *in vivo*. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 111p. 2014..

TORRES, M. Estudo do miocárdio na moléstia de Chagas (forma aguda). I- Alterações da fibra muscular cardíaca. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 9, p. 114 – 139, 1917.

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

World Health Organization (WHO) The World Health Report 2017: Reducing Risk, Promoting Healthy Life. Geneva: **World Health Organization**, 2017.