

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

**Estudos farmacocinéticos da forma recombinante da
proteína P21 de *Trypanosoma cruzi***

Patrícia de Castilhos

Uberlândia
Julho – 2017

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

**Estudos farmacocinéticos da forma recombinante da
proteína P21 de *Trypanosoma cruzi***

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

Patrícia de Castilhos

Prof. Dra. Maria Aparecida de Sousa
(orientador)

Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva
(coorientador)

Uberlândia
Julho – 2017

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

- C352e
2017 Castilhos, Patricia de , 1984
 Estudos farmacocinéticos da forma recombinante da proteína P21 de *Trypanosoma cruzi* / Patricia de Castilhos. - 2017.
 84 f. : il.
- Orientadora: Maria Aparecida de Sousa.
 Coorientador: Claudio Vieira da Silva.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 3. Farmacocinética - Teses. 4. Chagas, Doença de - Teses. I. Sousa, Maria Aparecida de. II. Silva, Claudio Vieira da, 1972. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Patrícia de Castilhos

“Estudos farmacocinéticos da forma recombinante da proteína P21 de *Trypanosoma cruzi*”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

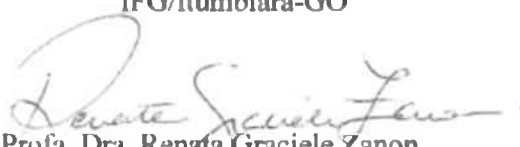
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

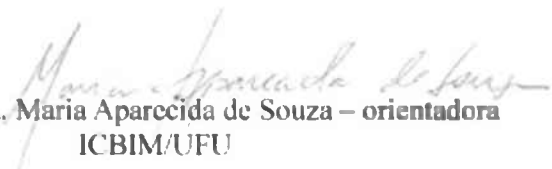
Uberlândia, 14 de julho de 2017.


Prof. Dr. Fernando dos Reis de Carvalho
IFG/Itumbiara-GO


Profa. Dra. Angelica de Oliveira Gomes
UFTM/Uberaba


Profa. Dra. Renata Graciele Zanon
ICBIM/UFU


Prof. Dr. Sydney Magno da Silva
ICBIM/UFU


Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza – orientadora
ICBIM/UFU

Dedicatória

Dedico a todos que me apoiaram nessa trajetória. “Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”
Antoine de Saint-Exupéry.

*Principalmente aos meus pais, irmã e meu marido pelo amor, pelo carinho, pelo
companheirismo durante toda a minha vida.*

*“ Sou um pouco de todos que
conheci, um pouco dos
lugares que fui, um pouco das
saudades que deixei e sou
muito das coisas que gostei. ”*

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre esteve ao meu lado e me guiou, iluminou e me deu tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Aos meu pais, Celonir e Maria Dulce, que sempre primaram pela minha educação, e me mostraram o quanto era importante estudar. Me oferecerem todas as oportunidades, estiveram presentes em todos os momentos da minha vida e me fazem muito feliz por isso. Além de pais, são grandes amigos e companheiros, mudaram suas rotinas para me acolher e facilitar toda a minha vida e sempre com tanto amor.

Agradeço a minha querida irmã Simone, que me apoia incondicionalmente, com belas palavras de apoio, amor, carinho e muita alegria, tornando minha vida mais leve e feliz. Também abriu mão de muitas coisas para me ajudar nessa conquista, sem você eu não conseguiria.

Ao meu marido, Alan, por ser meu maior incentivador dessa conquista. Sem você não teria força para encarar o desafio. Você não é só meu marido, é meu amigo, companheiro, parceiro e compreendeu como poucos os meus momentos de estresse e ausência, me dando força quando estava fraca. Seu apoio me faz querer crescer cada vez mais e buscar sempre o melhor desse mundo para as nossas vidas. Cada dia que passa percebo que meu amor e minha admiração por você só crescem e que com certeza teremos nosso quintal com cadeiras de balanço.

Meu doutorado é, sem dúvida nenhuma, resultado do trabalho de toda a minha família. Como sempre brinquei, todos podem utilizar esse título com o maior orgulho. Muito obrigada!

Aos meus sogros, Vanderlei e Lúcia, muito obrigada pelo incentivo, compreensão e encorajamento, durante todo este período. A Milena, Walterson, João Pedro, Ana Lara e Mariana pelo exemplo de família e união que me deram ao longo da vida e a Aline e Wendel, pelo infinito apoio e pelos momentos de entusiasmo compartilhados. Vocês tornam minha vida infinitamente mais feliz.

À minha orientadora Dra. Maria Aparecida de Souza, que foi a responsável por me acolher após tantos anos. Confiou e acreditou no meu trabalho mesmo com a distância que enfrentaríamos. Desde o mestrado me deu suporte, pessoal e profissional, e sempre com um carinho incomparável. Um modelo de vida e pessoa a ser seguido.

Agradeço muito ao meu coorientador, Dr. Claudio Vieira da Silva. Resumi-lo a meu coorientador é muito pouco e tenho certeza que ele sabe a importância que teve e tem para mim,

não só na condução do trabalho, mas também na minha vida, sendo meu companheiro e amigo. Muito obrigada pela sua cumplicidade e responsabilidade direta na construção desta Tese.

Agradeço também aos meus amigos que de uma forma ou de outra contribuíram com sua força e estímulo para que eu conseguisse completar este percurso. Nos momentos mais difíceis e de ausência, que não foram poucos, sempre me fizeram acreditar que eu chegaria ao final desta difícil, porém gratificante etapa.

Agradecimento especial aos meus colegas do LATRI pelo incondicional apoio e envolvimento para o desenvolvimento deste estudo. Foram inúmeras conversas científicas que, um dia, espero retribuir de algum modo. Muito obrigada a todos!

À equipe do ICBIM pela incansável vontade em me receber sempre com sorriso no rosto e muita disposição.

Aos técnicos e professores da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio técnico e financeiro para que esse trabalho fosse realizado.

Por fim, agradeço aos meus colegas e diretores do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás (IFG), principalmente do Câmpus Formosa, com quem tenho tido a oportunidade de unir uma convivência agradável, companheira e produtiva com trabalho responsável e de qualidade. Acredito muito em nossa instituição.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	Absorbância
AKT	Serina/treonina quinase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASM	Esfingomielinase ácida
BALB/c	Linhagem de camundongos albinos
BL-21	Linhagem de <i>Escherichia coli</i>
BSA	Bovine serum albumine (Albumina sérica bovina)
C57BL/6	Linhagem de camundongos
Ca⁺²	Cálcio
CBEA	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal
CCC	Cardiopatia chagásica crônica
CXCR4	Receptor de quimiocina do tipo 4 (C-X-C chemokine receptor type 4)
DAB	3,3 diaminobenzidina tetrahidrocloreto
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (Ensaio imunoenzimático)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
gp35	Glicoproteína de superfície de 35 kDa
gp50	Glicoproteína de 50 kDa
gp82	Glicoproteína de superfície de 82 kDa
gp83	Glicoproteínas de superfície de 83kDa
gp85	Glicoproteína de superfície de 85 kDa
H.E	Hematoxilina e eosina
HeLa	Linhagem de células de carcinoma epitelioide de cérvix humano
HRP	horseradish peroxidase
IE	Índice ELISA

IFN-g	Interferon Gama
IgG	Imunoglobulina G
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-4	Interleucina 4
ImageJ	Image Processing and Analysis in Java
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	Quilodalton
Kit ECL	Enhanced chemiluminescence
LAMP-1	Proteína de membrana associada ao lisossomo
LB	Meio Luria-Bertani
MPO	mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NAG	N- acetilglicosaminidase
OD	Densidade ótica
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	fenilenodiamina
p21	Proteína de secreção de <i>T. cruzi</i> de 21KDa
PBS	Tampão fosfato salino (Phosphate buffered saline)
PBS-T	Tampão fosfato salino com Tween
Pet-28a	Plasmídeos Recombinantes
PGN	Gelatina diluída em PBS
PI3-quinase	Fosfatidilinositol-3
PM	Peso molecular
POP Tc80	Prolil oligopeptidase
PPD	parafenilenodiamina
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
rP21	Proteína recombinante 21 de <i>T. cruzi</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium (Meio do Instituto Roswell Park Memorial)
SAP	Serine-, Alanine-, and Proline-Rich protein

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (Gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio)
SFB	Soro fetal bovino
sFlt-1	Soluble fms-like tyrosine kinase 1
SRL	Lectina de <i>Sclerotium rolfsii</i> ,
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TBS-T	Tampão Tris salino com Tween
Tc85	Glicoproteínas de superfície de 85KDa
Tris-HCl	Cloridrato de trizma.
TRITC	Tetramethylrhodamina
TS	Trans-sialidase
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo de imunização de coelho com proteína rP21 14

Tabela 2 – Análise qualitativa do infiltrado de células nos tecidos dos animais tratados com rP21. 33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do protocolo de purificação e renovelamento da rP21.....	13
Figura 2 – Pureza da proteína recombinante rP21.....	24
Figura 3 – (A) Determinação do título do soro policlonal de coelho anti-rP21. (B) SDS-PAGE 12% e especificidade do soro policlonal anti-p21.....	26
Figura 4 – Presença de rP21 no soro dos animais tratados pela via subcutânea.....	27
Figura 5 – Deposição da proteína rP21 nas glândulas do estômago após administração oral.....	29
Figura 6 – Depósito da proteína rP21 no tecido epitelial do estômago.....	31
Figura 7 - Proteína recombinante rP21 altera a quantidade de colágeno tipo I no tecido conjuntivo do estômago após administração via subcutânea.....	36
Figura 8 – Proteína recombinante rP21 não altera a quantidade de colágeno tipo I e III no esôfago e intestino grosso.....	38
Figura 9 – A quantidade porcentual de colágeno I e III não são alteradas no fígado e no baço dos animais tratados com rP21.....	40
Figura 10 – Proteína rP21 não altera a porcentual de colágeno tipo I e III no rim e no coração.....	42
Figura 11 – Estabilidade da proteína rP21 frente as proteases do soro de camundongo.....	43
Figura 12 – Atividade pró-fagocítica da rP21 é mantida após tratamento com proteínas do soro.....	45

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
1.1	Proteína rP21	5
1.2	Utilização de proteínas recombinantes como biomarcadores ou alvo de terapêuticas	8
2	Objetivos	11
3	Material e Métodos.....	12
3.1	Purificação da proteína recombinante rP21	12
3.2	Obtenção dos animais	13
3.3	Produção de soro imune em Coelhos	14
3.3.1	Imunização dos coelhos	14
3.3.2	Titulação do soro para pesquisa de antígenos no sangue e nos tecidos	15
3.3.3	Especificidade do soro anti- rP21 por “Western Blotting”	16
3.4	Deposição de rP21 em diferentes tecidos de animais C57BL/6 saudáveis	17
3.4.1	Tratamento dos animais com rP21	17
3.4.2	Inclusão na parafina	17
3.4.3	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	18
3.4.4	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima – ELISA	19
3.5	Atividades biológicas da rP21 nos tecidos dos camundongos saudáveis	20
3.5.1	Análises histopatológicas	20
3.5.2	Coloração de Picrosirius Red	21
3.6	Teste de degradação da rP21 pelas proteases do soro de camundongo	22
3.6.1	Degradação proteica	22
3.6.2	Ensaio de fagocitose de partículas de zimozan	22

4	Resultados	24
4.1	Purificação e caracterização da proteína rP21	24
4.2	Titulação por ELISA do soro anti-rP21 e especificidade do soro por Western Blotting	25
4.3	Distribuição da proteína rP21 nos tecidos dos animais tratados e as atividades biológicas	26
4.3.1	Detecção, por ELISA, da proteína rP21 no soro dos animais tratados	26
4.3.2	Localização da rP21 no estômago por Imunofluorescência (RIFI).....	27
4.3.3	Análise histopatológica dos tecidos dos animais	31
4.3.4	A proteína rP21 influencia na análise morfológica de colágeno presente no estômago.....	34
4.4	A proteína rP21 mantém estabilidade quando incubada com soro de camundongos e não perde atividade pró-fagocítica	43
5	Discussão.....	46
6	Conclusões	56
7	Referências Bibliográficas	57
8	Anexo 1	66

RESUMO

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* está entre os mais bem-sucedidos parasitos intracelulares. Durante o processo de invasão celular ocorre a participação de muitas moléculas de superfície do parasito que se associam a receptores na superfície da célula hospedeira. Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa identificou em *T. cruzi* uma nova proteína de 21 kDa, envolvida na invasão celular, chamada de P21. A forma recombinante da P21 (rP21) é utilizada em estudos sobre aspectos biológicos de *T. cruzi* proporcionando elucidar a função da mesma sobre a infecção do protozoário, sua relação na interação patógeno – hospedeiro e aplicação em novos testes de diagnóstico ou tratamento. Nessa vertente, avaliações farmacocinéticas são essenciais para a validação destes potenciais empregos da proteína. Este trabalho teve como objetivo estudar a farmacocinética da proteína recombinante rP21 relacionados à sua distribuição tecidual, eliminação e estabilidade após administração pela via oral e subcutânea em modelo murino. Para isso, inicialmente, foram obtidos anticorpos policlonais de coelho anti-rP21, efetivos e com alta especificidade pela proteína nas reações por ELISA e *Western Blotting*. Após o período de 72 horas da administração, a proteína estava presente nas amostras de soros dos camundongos tratados pela via subcutânea (50 e 200µg) e não foi detectável nas fezes e urina dos animais tratados, indicando sua distribuição pela via sanguínea. A distribuição tecidual da proteína rP21 foi observada por RIFI e somente o estômago apresentou deposição da proteína, com comportamento diferente em cada via. Pela via oral, a proteína foi visualizada nas glândulas estomacais, com a porcentagem de fluorescência cerca de 5x maior nos animais tratados com 200µg se comparados ao grupo controle PBS. Pela via subcutânea, rP21 pode ser observada na túnica muscular do estômago, com porcentagem de fluorescência 20 vezes maior no grupo com administração de 200 µg do que nos animais controle. Estes dados indicam que este órgão tem receptores que fazem com que a proteína fique ligada nos mesmos. Também foi observado no estômago uma diferença de porcentual de colágeno tecidual quando tratados com 200µg de proteína e ainda foi capaz de estimular levemente uma alteração na população de células do sistema inflamatório, mas sem danos teciduais. A proteína também não foi degradada pelas proteases do soro dos camundongos e não perdeu suas atividades pró-fagocíticas mesmo após incubação por 24 horas com as proteases do soro dos camundongos. Dessa forma, nosso trabalho vem demonstrar que a proteína rP21 pode ser explorada para a melhoria do diagnóstico ou do tratamento da Doença de Chagas, pois não apresenta toxicidade para os tecidos saudáveis, podendo ser administrada em animais para realizar um estudo sobre a fase crônica da Doença de Chagas. Além disso, ela se mantém estável mesmo na presença de proteases do soro,

permanece na corrente sanguínea por um período, e é capaz de se ligar a órgãos importantes no desenvolvimento da doença.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, rP21, farmacocinética, biodistribuição.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is a flagellate protozoan and is among most successful intracellular parasites. During cell invasion process, occurs many associations between parasite surface molecules and receptors on surface of host cell occur. In this context, our research group, identified in *T. cruzi*, a new protein of 21 kDa, involved in the cellular invasion, designate P21. Recombinant form of P21 (rP21) is used in studies on biological aspects of *T. cruzi* providing elucidation of its function on protozoan infection, its relation in pathogen - host interaction and application in new diagnostic or treatment tests. In this regard, pharmacokinetic evaluations are essential for validation of these potential uses of protein. This work aimed to study the pharmacokinetics of recombinant protein rP21 related to its tissue distribution, elimination and stability after oral and subcutaneous administration in murine model. For this, were obtained rabbit polyclonal anti-rP21 antibodies, effective and with high protein specificity, in the *ELISA* and *Western Blotting*, at a 1: 200 dilution. After the 72-hour administration, the protein was present in serum samples from mice treated by the subcutaneous administration (50 and 200 µg) and was not detectable in feces and urine of the treated animals, indicating their distribution through bloodstream. Tissue distribution of the rP21 protein was observed by RIFI and only the stomach presented deposition of protein, with different behavior in each pathway. By oral route, the protein was visualized in the stomach glands, with the percentage of fluorescence being about 5x greater in animals treated with 200µg. By the subcutaneous administration, rP21 can be observed in the muscular tunica of stomach, with a percentage of fluorescence 20 times greater than in the control animals. These data indicate that this organ has receptors that cause the protein to bind to them. A difference in percentage of tissue collagen was also observed in stomach when the animals was treated with 200µg of protein and had slight changes in the population of the inflammatory system, but without tissue damage. The protein was also not degraded by the serum proteases of mice and did not miss its phagocytic activities even after incubation for 24 hours with the serum proteases of the mice. Thus, our work demonstrates that the rP21 protein can be exploited to improve the diagnosis or treatment of Chagas disease, since it does not present toxicity to healthy tissues and can be administered to animals to perform a study on chronic phase of Chagas Disease. In addition, it remains stable even in the presence of serum proteases, remains in the bloodstream for a period, and is capable of binding to important organs in development of the disease.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*, rP21, pharmacokinetics, biodistribution.

1 Introdução

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* pertence à Ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, e está entre os mais bem-sucedidos parasitos intracelulares. Poucos protozoários comparam-se a ele em termos de virulência e capacidade de infectar vários tipos de células (Nunes *et al.*, 2013). A invasão das células de mamíferos por *T. cruzi* aciona diversas estruturas celulares. O parasito e a estruturas da célula hospedeira interagem durante o processo de infecção e podem envolver mecanismos distintos (Mortara *et al.*, 2008; Rassi e Marin-Neto, 2010), causando diferentes patogenias e sintomas no hospedeiro, que caracterizam a Doença de Chagas.

A Doença de Chagas foi descrita em 1909, pelo pesquisador Carlos Ribeiro Justianiano das Chagas (1878 – 1934) e atualmente, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), acomete quase 6 milhões de pessoas na América Latina (Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates, 2015). Os desafios são ampliados quando estimativas globais apontam que mais de 80% dos indivíduos afetados pela doença não tem acesso ao diagnóstico e tratamento adequados (Dias *et al.*, 2016), ocasionando o alto impacto da morbidade e da mortalidade desta doença.

Trypanosoma cruzi tem alta prevalência na natureza, com ciclo de vida digenético e heteroxênico. Caracteriza-se morfologicamente por apresentar os estágios evolutivos de epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. Cada um dos estágios apresentam alterações morfológicas e genéticas que lhe permitem se adaptar a diferentes microambientes em seus hospedeiros invertebrados e vertebrados (Patino e Ramírez, 2017).

O ciclo de vida deste protozoário envolve a transmissão durante o processo de repasto sanguíneo de um inseto hematófago, triatomíneo, conhecido como “barbeiro”. O repasto é realizado em mamíferos, incluindo o homem e outros animais, e pelo sistema excretor do inseto são eliminadas as formas infectantes de *T. cruzi*. Além da transmissão através do inseto, o parasito pode ser transmitido por via oral (Pereira *et al.*, 2010), via congênita (Gebrekristos e Buekens, 2014), por transfusão sanguínea (Leiby *et al.*, 2017), doação de órgãos, e até mesmo por acidentes laboratoriais (Kinoshita-Yanaga *et al.*, 2009).

Considerando o mecanismo vetoral de infecção por *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado, a forma tripomastigota metacíclica, eliminada nas fezes e urina do vetor, penetra no hospedeiro pelo local da picada. Na corrente sanguínea do novo hospedeiro, tripomastigotas metacíclicos

invadem várias células, formando um vacúolo parasitóforo intracelular, onde se diferenciam em amastigotas, forma arredondada e sem flagelo externo, seguido do rompimento do vacúolo. Esta é a forma replicativa do parasito e após o rompimento da membrana do vacúolo multiplicam intensamente no citoplasma por divisão binária. Posteriormente a divisão diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos em cerca de cinco dias. Esta forma apresenta movimentos constantes e intensos e, assim, ocorre a ruptura das células e os protozoários caem na corrente circulatória. Os parasitos podem, então, atingir outras células de qualquer tecido ou órgão para cumprir novo ciclo celular, podem ser destruídos por mecanismos imunológicos do hospedeiro, ou serem ingeridos pelo inseto durante o repasto sanguíneo. No inseto vetor a forma tripomastigota sanguínea ingerida se transforma em epimastigota no estômago, dividindo-se no intestino médio até se diferenciarem em tripomastigotas metacíclicos no intestino posterior. Ao se alimentar novamente o inseto defeca, eliminando formas infectantes do parasito, e o ciclo recomeça (Carrea e Diambra, 2016).

A Doença de Chagas apresenta duas fases sucessivas, a aguda e a crônica. Após a infecção por *T. cruzi*, o indivíduo desenvolve a fase aguda, determinada pela presença de tripomastigotas no sangue do paciente e possui duração variável tanto na infecção humana quanto na experimental, de seis a oito semanas, em média (Nunes *et al.*, 2013). A fase crônica inicia-se logo após o fim deste período, na qual os pacientes podem desenvolver quadros clínicos variados, desde brandos a muito graves e os parasitos tornam-se raros no sangue e outros tecidos (Bhattacharyya *et al.*, 2010).

Na evolução da doença, na fase crônica, pode-se desenvolver a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), que representa a primeira causa de lesões cardíacas em jovens e adultos economicamente ativos nos países endêmicos. Essa condição causa alta morbidade na população e muitas vezes uma mortalidade precoce da população jovem, resultando em grandes perdas econômicas (Nunes *et al.*, 2013; Pereira Júnior e Markman Filho, 2014).

Complicações cardíacas e digestivas frequentemente levam a necessidade de longos períodos de tratamento e procedimentos cirúrgicos, aumentando os custos com a doença. Dessa forma, estudos que possam auxiliar na compreensão dos mecanismos patogênicos da infecção por *T. cruzi* são de grande importância para a aplicação médica e saúde pública.

A invasão celular é um passo essencial para o desenvolvimento da Doença de Chagas. É o fator que precede a replicação intracelular do parasito e a liberação dos tripomastigotas infectivos na corrente sanguínea do hospedeiro (Nunes *et al.*, 2013). Fatores celulares e moleculares do hospedeiro estão envolvidos na resistência à infecção por *T. cruzi*, bem como

em processos inflamatórios e patogênicos, destacando-se a produção de quimiocinas, citocinas e de óxido nítrico (Epting *et al.*, 2010).

Durante o processo de infecção e interação *T. cruzi* – célula hospedeira, o protozoário primeiro se adere à superfície da célula alvo sendo, subsequentemente, internalizado. Entretanto, nem todos os parasitos que estão aderidos a essa superfície permanecem fixos a ela. O grau de adesão varia de acordo com os tipos de célula hospedeira, forma (tripomastigotas, amastigotas) e cepa do parasito (Rassi e Marin-Neto, 2010).

Uma filmagem realizada em 1973, por Dvorak e Hyde, possibilitou amplo conhecimento sobre o processo de invasão de *T. cruzi*. Foi demonstrado que durante a entrada de tripomastigotas na célula não há protusões ou formações de grande quantidade de projeções da membrana celular do hospedeiro (Dvorak e Hyde, 1973; Hyde e Dvorak, 1973). Com o avanço dos estudos foi possível verificar a forte associação entre o parasito e a membrana da célula hospedeira, na qual, após a internalização, há a formação de um vacúolo contendo o parasito (Fernandes e Andrews, 2012).

É conhecido que *T. cruzi* invade a maioria das células nucleadas por um mecanismo distinto da fagocitose clássica (Fernandes e Andrews, 2012). Na célula hospedeira há o recrutamento de lisossomos, no local da ligação do parasito, para a formação do vacuolo parasitóforo. Esse processo ocorre antes do final da internalização com os vacúolos parasitóforos recém-formados e já contendo alguns marcadores lisossômicos como o LAMP-1 (Tardieux *et al.*, 1992).

Durante o processo de invasão, tanto no parasito como na célula hospedeira, ocorre um aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{+2} , que estimula a despolimerização do citoesqueleto na região de invasão na célula hospedeira, facilitando a entrada do parasito (Tardieux *et al.*, 1994). Essa alteração nos níveis de Ca^{+2} resulta na liberação extracelular da enzima esfingomielinase ácida (ASM) e indução de formação de ceramida na membrana celular, reparando-a e mantendo o parasito dentro de um vacuolo (Fernandes *et al.*, 2011).

Neste processo, ocorre a participação de muitas moléculas de superfície do parasito que se associam a grupos de carboidratos em receptores na superfície da célula hospedeira (Kahn *et al.*, 1995; Yoshida, 2006). Esses receptores celulares são explorados pelo parasito para mediar a invasão celular e garantir a sua sobrevivência intracelular (Borges *et al.*, 2016). Existem vários trabalhos que demonstram moléculas responsáveis pela interação *T. cruzi* – célula hospedeira, tanto no processo de adesão quanto no de internalização.

Várias moléculas das células hospedeiras já foram descritas como receptores das moléculas de *T. cruzi*, sendo predominantemente carboidratos, com resíduos de galactosil,

manosil ou sialil (Barrias *et al.*, 2013) e proteínas do tipo lectina, como galectina-3, capazes de se ligar em resíduos de carboidratos do parasito (Reignault *et al.*, 2014), entre outras. As moléculas de *T. cruzi* associadas a invasão podem ser moléculas de superfície (ligadas a membrana plasmática) ou serem secretadas pelo parasito durante o processo de instalação da infecção.

A via de sinalização pela ancoragem da trans-sialidases (membrana do parasito) com as moléculas no hospedeiro é utilizada por *T. cruzi* para invadir células do hospedeiro e tem grande importância para a instalação da infecção. A família das trans-sialidases (TS) é a maior família antigênica de *T. cruzi*, incluindo entre elas as moléculas gp82 e gp85, e é responsável em catalisar a transferência do ácido siálico à moléculas de mucina do parasito (Alves e Colli, 2008; Burgos *et al.*, 2013; Freire-De-Lima *et al.*, 2015).

As mucinas, glicoproteínas de superfície do parasito, como a gp35 e gp50, apresentam resistência a proteases do organismo e são reportadas como ligantes de *T. cruzi* aos receptores específicos das células hospedeiras, principalmente devido a seus resíduos de açúcar (Yoshida, 2006). As moléculas de mucina sialiladas estão envolvidas no processo de adesão e internalização do parasito nas células hospedeiras, alterando os níveis de Ca^{+2} em ambas as células (Borges *et al.*, 2016).

T. cruzi também secreta proteínas que apresentam alta porcentagem de serina, alanina e prolina, conhecidas como família SAP (*Serine-, Alanine- and Proline- rich protein*) (Zanforlin *et al.*, 2013). Estas proteínas induzem a ativação de vias de transdução de sinais que levam ao aumento da concentração intracelular de cálcio, evento crucial na interiorização do parasito (Tardieux *et al.*, 1994). Além das proteínas SAP, são conhecidas várias outras proteínas que garantem ao parasito sucesso na invasão celular, como Tc85, gp83, cruzipaina, oligopeptidase B, POP e Tc80 (Fernandes *et al.*, 2006; Yoshida, 2006; Maeda *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2016).

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa, em estudos anteriores, identificou em *T. cruzi*, um novo componente secretado, uma proteína de 21 kDa, envolvido na invasão celular por amastigotas e tripomastigotas metacíclicos, chamada de P21 (Da Silva *et al.*, 2009). Neste trabalho, os autores trataram as células hospedeiras com anticorpos policlonais desenvolvidos contra uma proteína recombinante baseada na forma nativa de P21 (rP21), e observaram a inibição do processo de invasão celular por formas amastigotas e tripomastigotas metacíclicos *in vitro*. Em contrapartida, com a adição da proteína recombinante rP21 em ensaios de invasão com amastigotas extracelulares e tripomastigotas metacíclicos em células HeLa, provocaram

um aumento significativo na invasão celular pelo protozoário também *in vitro*, demonstrando que a proteína está, também, envolvida na internalização do parasito.

1.1 Proteína rP21

A proteína P21 é uma proteína ubíqua, secretada por todas as formas de vida, do protozoário *T. cruzi* e não está correlacionada com nenhuma outra proteína de outra espécie parasitária (Da Silva *et al.*, 2009). Sabe-se que existe uma diferença de expressão de proteínas, inclusive de P21, nas diferentes cepas de *T. cruzi* (Fernandes *et al.*, 2013), entretanto a especificidade desta proteína garante ligações exclusivas entre o parasito e a célula hospedeira durante o processo de invasão e sobrevivência do protozoário.

Por meio da tecnologia do DNA recombinante, a forma recombinante da P21 (rP21), pode ser obtida a partir de cultura de *E. coli* transformada com plasmídeo contendo o gene que codifica a proteína P21. A proteína rP21 é uma proteína de 18kDa e apresenta uma cauda de 6 moléculas de histidina, o que facilita sua purificação em colunas de níquel (Da Silva *et al.*, 2009; Dos Santos *et al.*, 2014).

A rP21 é utilizada em estudos sobre aspectos biológicos de *Trypanosoma cruzi* proporcionando elucidar a função da mesma na infecção do protozoário e sua relação na interação patógeno – hospedeiro (Rodrigues *et al.*, 2012; Dos Santos *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2015).

Recentemente, trabalhos demonstraram que a proteína rP21 aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos por um mecanismo dependente da ligação da proteína ao receptor de quimiocinas CXCR4. Essa ligação induz a polimerização do citoesqueleto de actina da célula hospedeira e ativa a sinalização celular via PI3-quinase, de forma independente de AKT (Da Silva *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2012; Dos Santos *et al.*, 2014). A atividade pró-fagocítica da rP21 influencia de forma positiva no processo de invasão celular pelo parasito nas células alvos, pois ativa os macrófagos a internalizarem o protozoário aumentando o processo de invasão dessas células pelo parasito (Rodrigues *et al.*, 2012).

A atividade pro-fagocítica de P21 deve permitir que o parasito se mantenha intracelularmente, onde pode romper o compartimento do fagolisossomo e manter livremente no citoplasma da célula hospedeira enquanto que a polimerização do citoesqueleto de actina pode atuar no controle da replicação do parasita. Por conseguinte, o parasito por meio de controle de expressão gênica pode evitar a resposta do hospedeiro induzindo uma maior

expressão de proteínas que atuam diretamente na polimerização da actina do hospedeiro (Teixeira *et al.*, 2017).

Martins (2015) para verificar o papel do citoesqueleto de actina durante a infecção experimental com *T. cruzi*, infectou macrófagos e mioblastos com tripomastigotas e após 96 horas os mesmos foram tratados com IFN- γ ou rP21. Foi realizado a análise de multiplicação parasitária, bem como a observação da polimerização de actina (por imunofluorescência e citometria de fluxo). Como resultado, tanto as células tratadas com IFN- γ quanto com rP21, apresentaram um citoesqueleto mais rígido e menor multiplicação intracelular.

A rP21 também apresenta alta quimiotaxia de leucócitos e atividade anti-angiogênica. Após administração de rP21 ocorre aumento no recrutamento de células do sistema imunológico na cavidade abdominal quando comparado com os animais tratados com PBS, com um perfil de recrutamento semelhante ao de processos infecciosos. Os neutrófilos, a primeira linha de defesa do organismo, tem sua população mudada para macrófagos e linfócitos, gerando uma resposta mais específica. Este recrutamento de leucócitos também pode ser observado no aumento das atividades da enzima mieloperoxidase (MPO) e proteína N-acetilglicosamina (NAG), indicação indireta de acúmulo de neutrófilos e macrófagos respectivamente (Machado, 2014).

Em experimentos *in vivo* utilizando modelo de inflamação, com a implantação de esponja de poliéster no dorso dos camundongos e administração de diferentes quantidades de rP21 (10 μ g, 40 μ g ou 100 μ g) foi observado que ocorreu aumento na expressão de MPO, mas não de NAG, e esse aumento não estava correlacionado com a população de neutrófilos. Entretanto MPO também pode ser produzida por macrófagos e linfócitos B (Teixeira *et al.*, 2015).

Nos mesmos ensaios foi observado um aumento na expressão de interleucina 4 (IL-4), citocina com ação anti-inflamatória, que participa na diferenciação de linfócitos Th2. A quantidade de hemoglobina foi significativamente reduzida no grupo tratado com a proteína recombinante além de ter ocorrido uma diminuição da formação dos vasos sanguíneos, demonstrando que ela estaria inibindo a formação de vasos sanguíneos (Teixeira *et al.*, 2015).

Mesma atividade foi observada quando se utilizou células endoteliais. Embora a rP21 não tenha sido capaz de alterar a adesão ou viabilidade das células e não apresentar atividade proteolítica nos componentes da matriz extracelular, ela foi capaz de inibir fortemente a formação de vasos (Teixeira *et al.*, 2017).

No trabalho de Teixeira (2016) também foi observado o mecanismo antiangiogênico desencadeado pela P21, mas durante a etiologia e a progressão da CCC. Com os experimentos

realizados e de acordo com o conhecimento da literatura, acredita-se que com a produção contínua da P21 para o espaço extracelular pelas formas amastigotas de *T. cruzi*, localizadas no interior das fibras cardíacas, ocorre o recrutamento de leucócitos e aumento da produção de IL-4. Essa citocina também induz os macrófagos a adquirirem uma ativação alternativa (M2), caracterizados pelo aumento da produção de sFlt-1, molécula antiangiogênica, receptor solúvel de moléculas angiogênicas.

Terapeuticamente se busca a descoberta de novos tratamentos para eventos angiogênicos, como são os casos de muitos tumores. Recentemente, foi observado que a rP21 também apresenta uma atividade anti-tumoral em estudos realizados com tumores de Ehrlich. Nas células imortalizadas e tratadas com rP21 foi observado a redução do volume dos tumores em 7 dos 8 animais tratados, devido à inibição do crescimento do tumor. Também não houve alteração na viabilidade celular, sugerindo que a rP21 não atua interferindo na viabilidade das células tumorais diretamente. Contudo, ela poderia estar atuando na modulação do microambiente tumoral, na tentativa de conter a progressão do tumor com a inibição das células tumorais em macrófagos, conferindo à rP21 uma função anti-tumoral (Borges, 2015).

Assim, a proteína P21 vem demonstrando, em estudos realizados, possuir diferentes propriedades não apenas para o benefício do *T. cruzi* no momento de sua invasão, mas apontou um novo horizonte para estudos que trarão benefícios para terapias de diferentes doenças. Segundo Teixeira e colaboradores (2015) as atividades da proteína P21 permitem ao parasito a permanência no ambiente intracelular (devido ação quimiotática e atividade pró fagocítica) e a manutenção de baixo parasitismo nas células infectadas (regulação da polimerização de actina). Estas atividades sugerem que a proteína P21 desempenha papel fundamental na interação com as células hospedeiras. Assim, poderia garantir a perpetuação da infecção ao longo dos anos, com baixa ou nenhuma parasitemia, e permitindo a progressão para a fase crônica da doença.

Embora existam vários estudos sobre as propriedades da rP21, mais experimentos devem ser realizados para comprovar suas atividades. Como a proteína P21 é secretada por todas as formas evolutivas do parasito e por diferentes cepas de *T. cruzi*, além de desempenhar um papel relevante durante a invasão de células pelo protozoário (Da Silva *et al.*, 2009), é de suma importância realizar a análise da toxicidade desta proteína bem como avaliar sua estabilidade e distribuição no organismo para subsidiar seu uso no futuro como uma alternativa na terapêutica ou diagnóstico de Doença de Chagas.

Desta forma, os resultados destas análises poderão ser a pedra fundamental para o desenvolvimento e estabelecimento de estratégias de tratamentos eficazes abordando novas vertentes como alvos terapêuticos podendo, inclusive, beneficiar a população infectada.

1.2 Utilização de proteínas recombinantes como biomarcadores ou alvo de terapêuticas

Atualmente, o diagnóstico da Doença de Chagas ocorre de acordo com a fase da doença. Na fase aguda os principais métodos de diagnóstico utilizados são baseados na observação do parasito por meio de exames parasitológicos diretos, devido à grande quantidade de protozoários circulantes. Na fase crônica, as metodologias empregadas são baseadas na detecção de anticorpos através de testes sorológicos (principalmente ELISA), pois o organismo produz maior quantidade de anticorpos específicos direcionados a diferentes estruturas do protozoário (Santos *et al.*, 2016). Além disso, são acompanhadas de estudos por eletrocardiograma e estudos radiológicos de coração, esôfago e colo.

Para o tratamento da doença devem ser considerados os diferentes quadros de infecção por *T. cruzi*. Várias tentativas de tratamento específico foram propostas entre 1937 e 1960, porém não houve comprovação suficiente da eficácia terapêutica dos fármacos testados. Desde 1962 foi proposta uma avaliação da terapêutica mostrando a efetividade de compostos químicos como nifurtimox e benzonidazol contra as formas intracelulares do parasito (Bermudez *et al.*, 2016).

O nifurtimox deixou de ser comercializado, primeiro no Brasil e posteriormente em outros países da América do Sul como a Venezuela, Chile e Argentina, por não apresentar níveis consideráveis de combate à infecção (Olivera *et al.*, 2015). O benzonidazol é utilizado desde 1974, com eficácia durante a fase aguda, mas os pacientes apresentam reações adversas, tais como dermatites por hipersensibilidade, polineurite e depressão da medula óssea (Pinto *et al.*, 2013).

Após várias décadas da descoberta da Doença de Chagas o benzonidazol continua sendo a droga disponível para o tratamento específico. Podendo ter como alternativa o nifurtimox em caso de intolerância, entretanto é um medicamento de difícil obtenção.

Problemas como a baixa prioridade em programas de controle, geralmente ofuscados por atividades e programas de maior visibilidade e crédito político nacional, e a falta de financiamentos para investigação científica e para o desenvolvimento de fármacos são alguns desafios impostos para o controle da Doença de Chagas no Brasil. Outro fator importante é a relação intrínseca da doença com a situação da pobreza da população afetada, que dificulta ainda mais o incentivo pelos órgãos financiadores (Paucar *et al.*, 2016).

De certa forma, a simplicidade do diagnóstico e do tratamento da Doença de Chagas é considerada um dos pontos fundamentais para sua ampla aceitação e aplicação, sendo acessível à maioria dos centros médicos. Entretanto a metodologia dos exames emprega o uso de extratos brutos ou antígenos purificados/semipurificados de diferentes cepas de *T. cruzi*. Devido à complexidade antigênica do protozoário, os mesmos resultam em problemas de padronização, baixa confiabilidade e possibilidade de reatividade cruzada com outros microrganismos, principalmente *T. rangeli* e com espécies do gênero *Leishmania* (Santos *et al.*, 2016). Além disso, os medicamentos geralmente resultam em efeitos colaterais e alta toxicidade aos pacientes (Pinto *et al.*, 2013).

A tecnologia do DNA recombinante tem sido utilizada para isolar antígenos dominantes dos agentes causadores de infecções humanas. Alguns destes antígenos têm demonstrado resultados promissores com relação ao diagnóstico da Doença de Chagas (Umezawa *et al.*, 1999; Umezawa *et al.*, 2004).

O uso desta metodologia possui uma grande vantagem de não necessitar do cultivo e manutenção de cultura de parasitos para a obtenção dos antígenos, evitando o risco de infecção por acidente de laboratório, e não precisa de equipamentos específicos para manutenção dos mesmos. Assim, proteínas recombinantes passaram a ser melhor estudadas e utilizadas em diversos segmentos, dentre eles, na composição de testes diagnósticos mais acurados (Field *et al.*, 2017).

A aplicação de técnicas de biologia molecular permite a construção de *kits* de diagnósticos a partir de proteínas recombinantes para as doenças infecciosas. Existe também a possibilidade do uso das proteínas recombinantes serem uteis como ingrediente em uma composição imunogênica e/ou na produção de anticorpos eficazes para o tratamento de tais doenças (Abras *et al.*, 2016).

Assim, existem vários trabalhos envolvendo a busca por novas proteínas e compostos para aperfeiçoar o diagnóstico e tratamento da Doença de Chagas, visando a melhoria das condições de vida para pacientes chagásicos que ainda enfrentam, nos dias de hoje, uma difícil realidade (Umezawa *et al.*, 1999; Umezawa *et al.*, 2004; Caballero *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2009; Bhattacharyya *et al.*, 2010; Romero e Morilla, 2010; Gilber *et al.*, 2013; Llano *et al.*, 2014; Abras *et al.*, 2016; Brasil *et al.*, 2016; Paucar *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2016).

O estudo da P21 permite o acesso a uma proteína específica durante a infecção por *T. cruzi*, pois é constantemente secretada pelo protozoário e é de suma importância para o processo de invasão e permanência do parasito na célula hospedeira. Além disso, o processo de obtenção de rP21 pode ser considerado simples e de fácil reprodução laboratorial.

Assim, o uso dessa proteína em ensaios *in vivo* poderia ser estudado, avaliado e aplicado como um possível teste de diagnóstico ou tratamento de *T. cruzi* e ainda servindo para indicar cronificação da doença e alvo terapêutico para vacinas ou medicamentos. Entretanto, antes de se propor o emprego da rP21 como potencial agente terapêutico, diagnóstico ou adjuvante vacinal, estudos farmacocinéticos são essenciais para a validação destes potenciais empregos da proteína.

Assim, este trabalho, busca elucidar a distribuição tecidual da proteína recombinante rP21, sua excreção e estabilidade após administração em modelo murino, permitindo novos rumos para a aplicação dessa importante proteína.

2 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a farmacocinética da proteína recombinante rP21 relacionada à sua distribuição tecidual, eliminação e estabilidade após administração pela via oral e subcutânea em modelo murino.

Para tanto, os objetivos específicos foram delineados:

- Purificar a proteína recombinante rP21.
- Obter anticorpos policlonais de coelho anti-rP21.
- Detectar a deposição proteica de rP21 em diferentes tecidos saudáveis.
- Analisar as atividades biológicas já conhecidas da rP21 nos tecidos saudáveis após administração pela via oral e subcutânea.
- Determinar a estabilidade proteica da rP21 frente às proteases presentes no soro dos camundongos.

3 Material e Métodos

3.1 Purificação da proteína recombinante rP21

O protocolo de purificação da proteína recombinante rP21 utilizado foi descrito por (Da Silva *et al.*, 2009; Dos Santos *et al.*, 2014) (**Figura 1**). Brevemente, bactérias *Escherichia coli* da linhagem BL21, transfectadas com plasmídeo pET-28a(+) (Novagen) contendo o gene que codifica para a P21 foram mantidas em meio LB a 37°C com o antibiótico Kanamicina (50µg/ml ou 15µg/ml ou 0,035µg/ml) por 18h (pré-inóculo).

O pré-inóculo foi diluído 1:50 do mesmo meio e incubado a 37°C, sob agitação contínua, até atingir a densidade óptica (OD) de aproximadamente 0,5 a 0,9 aferida no espectrofotômetro (ABS 600nm). Após a medição foi adicionado 1mM de isopropil-tiogalactosídeo (IPTG), para indução da produção proteica, e incubação por mais 2 horas. Após esse período todo o volume de meio de cultura foi distribuído em frascos especiais e centrifugados a 10000 rpm (*Sorvall RC-5C Plus High-Speed-Centrifuge*) por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi autoclavado e desprezado, e o pellet foi ressuscitado com solução salina tamponada com fosfato (PBS), 1,3M, pH 7,2. O volume de cada tubo foi reunido num béquer pequeno de 50 ml, acrescido de lisozima (50 mg/ml). Após 10 minutos a amostra foi sonicada e depois centrifugada a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em solução de ureia 6M (Amresco 0378).

A proteína recombinante rP21 possui uma cauda de histidina. Proteínas que possuem caudas de histidina podem ser purificadas facilmente através de protocolos relativamente simples utilizando cromatografia de afinidade, como por exemplo, coluna de níquel. A amostra foi incubada com resina de níquel, por 2 horas, sob agitação, a 4°C. Após três lavagens em *Binding Buffer* (imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, ureia 6M), a resina foi lavada três vezes com *Washing Buffer*, tampão de lavagem (imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, Tris- HCl 20 mM, pH 8,0, ureia 6M).

Por fim, quatro eluições com *Elution Buffer*, tampão de eluição (imidazol 1M, NaCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, ureia 6M), contendo aumentadas concentrações de imidazol para competir com a cauda de histidina pela coluna de níquel e liberar a proteína recombinante purificada.

Todo o material eluído foi dialisado contra tampão PBS com uma membrana de diálise de 3,5kDa (Spectra/Por 131198) por 48 horas para a purificação da proteína dos resíduos de ureia e outros.



Figura 1 - Esquema do protocolo de purificação e renovelamento da rP21. Obtenção da proteína a partir dos corpos de inclusão do extrato bacteriano de *E. coli* utilizando meio LB, cromatografia de afinidade por coluna de níquel e diálise contra tampão PBS (Santos, 2013).

Após a diálise a amostra purificada foi aplicada em gel de eletroforese em condições desnaturantes a 12% SDS-PAGE (Laemmli, 1970) com coloração de Coomassie Brilliant Blue, para confirmação da sua presença e pureza e a concentração da proteína foi quantificada utilizando *Thermo Scientific NanoDrop 2000 spectrophotometer* (280nm).

Como marcador de peso molecular de proteínas (PM), foi utilizado o PS-101 (*Jena Bioscience GmbH*). É um marcador composto de uma mistura de sete proteínas purificadas (β -galactosidase 116kDa, Fosforilase B 97,4kDa, Soro Albumina Bovina 66,2 kDa, Álcool Desidrogenase 37,6kDa, Anidrase Carbonica 28,5kDa, Mioglobulina 18,4kDa e Lisozima 14kDa) fornecidas em tampão de carga de gel para aplicação direta em um gel SDS-poliacrilamida.

3.2 Obtenção dos animais

A presente pesquisa foi aprovada pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia (protocolo número 082/16) (**Anexo 1**). Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Tripanosomatídeos do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU (ICBIM-UFU). Houve a colaboração dos

Laboratórios de Anatomia, Imunologia, Parasitologia, e Histologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, UFU.

Camundongos C57BL/6, machos, de seis a oito semanas de idade, e coelho macho da espécie *Oryctolagus cuniculus* foram mantidos em condições padrões de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e iluminação (ciclo alternando 12 horas com luz - 12 horas em ausência de luz), com alimento e água *ad libitum*. A manutenção e cuidado dos animais estavam de acordo com o Comitê de Ética Animal local, sendo que os animais foram fornecidos e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da UFU (CBEA-UFU).

A eutanásia dos animais foi realizada de acordo com os fundamentos internacionais de bem-estar animal, conforme Orientações da Associação Médica Veterinária em Eutanásia.

3.3 Produção de soro imune em Coelhos

3.3.1 Imunização dos coelhos

Para a produção dos anticorpos policlonais, foi utilizado um coelho macho da espécie *Oryctolagus cuniculus*, pesando aproximadamente 2,5 Kg, de acordo com (Gonçalves *et al.*, 2012). Antes da imunização, o animal passou por um processo de adaptação no biotério. O soro imune foi obtido com a administração intramuscular de 200µl da proteína rP21 (500 µg/ml) (obtida conforme descrito em 3.1) diluída em PBS, 1,3M, pH 7,2, adicionado de 200µl de adjuvante (**Tabela 1**). Na primeira imunização (1ª dose), utilizando adjuvante completo de Freund. Na segunda e terceira semanas após a primeira imunização, foi realizado um reforço (2ª e 3ª dose), com a mesma concentração, volume e via, utilizando adjuvante incompleto de Freund.

No vigésimo primeiro dia (21) após a primeira imunização, o animal foi submetido à punção cardíaca com sangria total e as amostras de sangue foram centrifugadas e o soro foi armazenado a -20°C até o momento de uso.

Tabela 1 – Protocolo de imunização de coelho com proteína rP21.

Dias	Antígeno (µg/ml)	Adjuvante	Via
1	500	Adjuvante completo de Freund.	Intramuscular
7	500	Adjuvante incompleto de Freund.	Intramuscular
14	500	Adjuvante incompleto de Freund.	Intramuscular

3.3.2 Titulação do soro para pesquisa de antígenos no sangue e nos tecidos

A titulação do soro anti-rP21 produzido em coelho foi realizada pelo teste ELISA indireto, com modificações (Gonçalves *et al.*, 2012). Ensaio preliminares foram realizados para otimizar as condições da reação. Foram testadas diferentes concentrações de proteína recombinante rP21 (40, 30, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,62µg/poço) em tampão carbonato-bicarbonato, 0,06M, pH 9,6, para sensibilizar as placas e diferentes tempos (120, 90, 60 e 45 minutos) de incubação das amostras com os anticorpos.

Após padronização, a cinética de detecção da proteína pelo soro anti-rP21 pelo teste ELISA foi realizada em placas de microtitulação de alta afinidade, sensibilizadas com 5µg/poço de rP21 em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9,6, por 18 horas a 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), 1,3M, pH 7,2, por 5 minutos e então adicionados 50 µl dos soros. Foram utilizados como controle, soro de camundongo anti-rP21 (controle positivo) (Dos Santos *et al.*, 2014) e soro de coelho não imune (controle negativo) diluídos em solução salina (PBS), em triplicata. Os soros a serem testados foram adicionados nas diluições de 1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, diluídos em PBS adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB).

As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C, sendo lavadas como descrito anteriormente e incubadas com 50 µl de soro de cabra anti IgG de coelho conjugado com enzima *horseradish peroxidase* (HRP) (1:2500), diluídos em PBS adicionado de 10% de SFB, por 1 hora a 37°C. Para revelação do controle positivo foi utilizado soro de macaco anti IgG de camundongo conjugado HRP (1:2500), diluídos em PBS e 10% de SFB. As placas foram lavadas novamente e reveladas pelo substrato o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich Co., Deisenhofen, Germany), após 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida adicionando-se 25 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N.

A densidade ótica (DO) foi determinada em leitor ELISA (*GloMax®Explorer System Promega*), 450nm. Os resultados foram expressos como Índice ELISA (IE), de acordo com a formula: $IE = \frac{DO \text{ da amostra}}{cut \text{ off}}$, onde cut-off foi estabelecido como a média de DO de três controles negativos acrescida de dois desvios padrões. As amostras foram consideradas positivas quanto Índice ELISA > 1.

$$IE = \frac{DO \text{ da amostra}}{Cut-off}$$

3.3.3 Especificidade do soro anti- rP21 por “*Western Blotting*”

Para caracterização do soro anti-rP21 quanto à especificidade, o mesmo foi testado por “*Western Blotting*”. Inicialmente, a rP21 (obtida de acordo com 3.1) foi diluída em tampão de amostra de eletroforese (SC 24945) (1:1). Depois foi realizado uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, (Laemmli, 1970), da proteína. Após a eletroforese, o gel foi cuidadosamente retirado do aparelho e equilibrado com solução tampão tris - glicina pH 8,3 (tampão de transferência).

Após eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas à membrana de nitrocelulose, montado no *Mini TransBlot Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad, EUA) e a transferência realizada a 400 mA, por 24 h. A membrana foi corada com solução de *Ponceau S* 0,5% em ácido acético 1% para verificar a eficácia da transferência.

Verificada a transferência, o corante foi retirado com PBS adicionada de 0,1% de Tween 20. Depois, a membrana foi bloqueada com solução salina tamponada com tris contendo 1% de Tween 20 adicionado mais 5% de leite em pó (TBS-TM), 1,5M, pH7,4, por 1 hora, com agitação constante e em temperatura ambiente. Então, a membrana foi lavada com TBS-TM, por 8 minutos cada, sob agitação. Para a reação de *Western blotting* foi empregado o soro do coelho anti-rP21, obtido em 2.2.

A membrana de nitrocelulose foi incubada com o soro do coelho anti-rP21 diluído em TBS-TM (1:200), sob agitação constante, *overnight* e à temperatura ambiente. Após o período de incubação, a membrana foi lavada três vezes com tampão de lavagem TBS-TM, oito minutos cada, sob agitação, e então foi incubada com o conjugado (anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase), na diluição de 1:2.500 em solução de TBS-TM por 1 h sob agitação e à temperatura ambiente.

Para a retirada do anticorpo secundário, foram realizadas novas lavagens, três vezes com TBS-TM, por oito minutos cada, sob agitação. Após a lavagem, a membrana foi retirada do aparelho de transferência e revelada com o substrato 3,3'-diaminobenzidina (Kit DAB SK-4100, Vector Laboratories, EUA) ou com o kit ECL *Advance Western blotting detection* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA), utilizado segundo recomendações do fabricante, analisado no aparelho *Amersham Imager 600*.

3.4 Deposição de rP21 em diferentes tecidos de animais C57BL/6 saudáveis

3.4.1 Tratamento dos animais com rP21

Os camundongos C57BL/6 foram tratados, via subcutânea (agulha hipodérmica) e via oral (agulha de gavagem), com 1µg, 50µg e 200µg da proteína rP21, diluídos em 200µl de solução salina tamponada com fosfato (PBS), 1,3M, pH7,2, e o grupo controle foi tratado com somente 200µl de solução PBS. Cada grupo foi composto por 6 animais, ou seja, 24 animais por cada via, totalizando 48 animais. Os animais foram acompanhados por 72 horas, prazo estimado para a deposição da proteína e possível atividade biológica que a rP21 possa desenvolver.

Após 72 horas, os animais foram eutanasiados e coletados sangue, urina e fezes. A coleta do sangue dos animais foi realizada através da órbita ocular dos mesmos, a coleta da urina foi feita de forma direta pelo ureter e da coleta do líquido da bexiga dos animais e a coleta das fezes foi realizada no intestino grosso de cada animal. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Também foram coletados, por cirurgia, os seguintes órgãos: coração, estômago, intestino grosso, esôfago, baço, fígado e rins. Estes órgãos foram selecionados por estarem ligados ao sistema imunológico do animal ou associados ao desenvolvimento da Doença de Chagas. Para a coleta do coração é retirado sangue interno do órgão com punção em PBS. Para a retirada do estômago e intestino grosso, os mesmos são abertos, lavados com PBS para a retirada do material orgânico, e então enrolados em hastes flexíveis, formando um rolo. Os órgãos foram armazenados em formaldeído tamponado 4%, 1,3M, pH7,2.

3.4.2 Inclusão na parafina

Para a observação ao microscópio de luz, todos os órgãos coletados foram incluídos na parafina. Inicialmente foi realizada desidratação do tecido em gradação com álcool etílico (70%, 85%, 95% e 100%). A inclusão em parafina foi precedida com o xilol, para remoção do álcool, e uma bateria de três vezes de infiltração em parafina líquida, mantida em estufa a 56°C (ponto de fusão) e posteriormente o mesmo foi transferido para o molde (bloco) contendo parafina líquida e aguardado 24 horas para endurecimento da parafina.

Os blocos foram levados para microtomia e para a obtenção das secções com 4µm de espessura, que foram então coletadas em lâminas de vidro. Essas lâminas contendo os cortes foram utilizados para reação de imunofluorescência indireta, coloração com hematoxilina e eosina e coloração por *Picrosirius Red*.

3.4.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Para detectar a deposição da proteína rP21 nos diferentes órgãos coletados os cortes foram submetidos a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (Quintal *et al.*, 2016). As laminae contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas, incubadas com solução salina tamponada com fosfato adicionado de glicina 3% por 10 minutos para retirada do pigmento formólico. Foram lavadas três vezes com PBS por cinco minutos cada, e então bloqueadas com BSA 2,5%, diluído em PBS, por 2 horas em temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas três vezes com PBS por 5 minutos cada.

Para evitar o *background* dos tecidos os cortes foram incubados com o reagente *Background Sniper* (Biocare Medical) por 15 minutos e novamente lavadas três vezes com PBS por cinco minutos cada. Para a marcação do anticorpo primário, o soro de coelho anti-rP21 (obtido em 3.2) foi diluído (1:200) em PBS + 0,1% saponina + 2,5% de soro fetal bovino para permeabilização das membranas e internalização celular dos anticorpos, em câmara úmida e protegida da luz, *overnight* a 4°C.

No dia seguinte as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com DAPI na concentração de 1:500 e anticorpo secundário anti-coelho produzido em cabra e conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), que emite luz verde no comprimento de onda de 488nm, na concentração de 1:2500 em solução tampão salina com gelatina (PGN) + 0,1% Saponina + 0,1% de Azul de Evans por 1 hora. Nas laminae dos animais com administração subcutânea de rP21, também foram avaliadas com o anticorpo secundário conjugado à rodamina (TRITC) na concentração de 1:2500 nas mesmas soluções e tempo, para verificar se existe marcações inespecíficas com os anticorpos secundários. As lâminas foram lavadas em PBS e montadas em glicerol tamponado com PBS pH 9,0 e 0,1% parafenilenodiamina (PPD) e examinadas no microscópio invertido de fluorescência acoplado com câmera fotográfica digital *NIKON Eclipse TiS*.

Após a coloração com RIFI e calibração do microscópio, foram documentadas 5 imagens por lamina (animal), gerando 30 fotomicrografias por grupo e totalizando 240 imagens analisadas para cada órgão, somando 1680 fotomicrografias.

As porcentagens da área de fluorescência por campo das fotomicrografias foram analisadas no *software ImageJ*, disponível em <https://ImageJ.nih.gov/ij/>, medindo a de área do órgão por campo (μm^2 /campo) e a área de fluorescência do órgão por campo (μm^2 /campo) em cada fotomicrografia. Somente as fotomicrografias dos cortes corados com anticorpo secundário conjugado com FITC foram analisadas no *ImageJ*. Inicialmente foi realizada uma calibração de escala, a distância de *pixels*/ μm , utilizando uma fotomicrografia com escala conhecida (435 pixels/100 μm).

Após a calibração, a área do órgão por campo foi obtida com a ferramenta de seleção *Freehand line*, para circular o que era tecido na foto, e *Analyze* e depois *Measure*. A área de fluorescência do órgão por campo (fotomicrografia) foi obtida pela ferramenta *Threshold*, com mesmo padrão de *Hue*, *Saturation* e *Brightness* para cada foto de cada órgão, e então, realizado o *Measure*.

Os resultados foram expressos como porcentagem de fluorescência, de acordo com a formula: **área de fluorescência/área do órgão por campo x 100**. Esses resultados foram, posteriormente, plotados no *software GraphPad Prism 6.0*, para análises estatísticas não paramétricas (*Dunn's Multiple Comparison*).

3.4.4 Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima – ELISA

Para detectar a presença de rP21 nas fezes, urina e soro dos camundongos tratados, amostras foram coletadas e foi realizado um ELISA direto, com modificações (Gonçalves *et al.*, 2010; 2012). O sangue foi centrifugado a 1.500rpm por 10 minutos a 4°C e foram coletados o soro de cada amostra. As fezes coletadas foram diluídas em PBS, 1:1 (cada 100 μg de fezes em 100 μl de PBS), maceradas e levemente centrifugadas para deposição do material orgânico em excesso e o sobrenadante foi armazenado. A urina coletada, o soro e o sobrenadante das fezes foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

As placas foram sensibilizadas com 50 μl das amostras (urina, fezes ou soro) diluídas 1:2 em tampão carbonato-bicarbonato, 0,06M, pH 9,6, por 18 horas a 4°C. Foi utilizado como

controle positivo da reação, a proteína rP21 (5µg/poço), diluída em tampão carbonato-bicarbonato, 0,06M, pH 9,6.

Após a sensibilização, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T por 5 minutos cada e então adicionados 50µL do soro de coelho anti-rP21, diluído em PBS adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB), 1:200, obtido em 3.2, por 1 hora a 37°C.

Para a retirada do anticorpo primário, as placas foram lavadas como descrito anteriormente e novamente incubadas com 50µl do soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado com HRP (1:2.500), diluído em PBS adicionado de 10% de SFB, por uma hora a 37°C. Foram realizadas novas lavagem com PBS-T (5x) e reveladas pelo substrato o-fenilenodiamina (OPD) (*Sigma-Aldrich Co., Deisenhofen, Alemanha*).

Após 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida adicionando-se 25µl de H₂SO₄ 2N. A densidade óptica foi determinada a 450nm, em leitor de placa de ELISA.

Os resultados foram expressos como Índice Elisa, consideradas positivas quando IE > 1, de acordo com 3.2.2. Esses resultados foram, posteriormente, plotados no *software GraphPad Prism 6.0*, para análises estatísticas não paramétricas (*Tukey's multiple comparisons test*).

3.5 Atividades biológicas da rP21 nos tecidos dos camundongos saudáveis

3.5.1 Análises histopatológicas

Os animais do item 3.2.2 também foram analisados quanto ao perfil histopatológico dos seus tecidos. Para a avaliação qualitativa da resposta inflamatória os cortes foram desparafinizados e corados com hematoxilina e eosina (H.E). Foram observados o tipo e a severidade do infiltrado inflamatório nos cortes histológicos de todos os órgãos coletados, em todos os animais dos grupos (duplicata).

O tipo e a severidade do infiltrado inflamatório foram determinados pela ausência ou presença de (i) reação inflamatória, (ii) neutrófilos, (iii) macrófagos, (iv) linfócitos, (v) plasmócitos e (vi) necrose. Essas características foram avaliadas por intensidade: (-) ausente,

(+) leve, (++) moderada e (+++) intensa. A análise foi feita por animal, mas como resultado foi realizada a média de cada grupo.

Todas as análises foram feitas com a objetiva de 40X de aumento, em ensaio duplo cego independente. O ensaio foi analisado por patologista experiente, que não conhecia o *design* e nem os dados da pesquisa, para manter a veracidade dos dados sem manipulação, por envolver uma análise qualitativa e subjetiva.

3.5.2 Coloração de *Picrosirius Red*

Para análise da influência da rP21 na diferenciação de colágeno I e III, os cortes foram submetidos à coloração em *Picrosirius Red*, que permite identificar as fibras de colágeno depositadas no tecido (Junqueira *et al.*, 1979). A análise da porcentagem do colágeno pode indicar alterações na composição do tecido da matriz extracelular, fibrose, necrose tecidual e até e carcinomas epiteliais.

Para a quantificação de colágeno I e III, foi utilizado microscópio invertido de fluorescência *Nikon Eclipse TiS* com luz polarizada acoplada ao analisador de imagem digital para quantificação da área por diferença de cor. Nesse sistema, o grau de birrefringência das fibras colágenas é avaliado através da intensidade de cor, no qual se delimita as faixas de espectros correspondentes a coloração do colágeno I e III. As fibras colágenas do tipo I emitem cor vermelha e as fibras colágenas III emitem cor verde, sendo que a sobreposição das cores emite cor amarelada para alaranjada (JUNQUEIRA *et al.*, 1979). As fotomicrografias foram obtidas em 20 campos aleatórios de cada corte no aumento de 20X ou 10X (dependendo do órgão), totalizando 120 fotomicrografias por grupo, 960 fotomicrografias por órgão, totalizando 6.720 fotomicrografias. Foram evitadas as áreas de inserção de vasos nos órgãos, pois é uma área muito rica em colágeno e poderia interferir no resultado final.

As fotomicrografias foram analisadas pelo *software ImageJ*, dosando a % de área de colágeno I ou % de área de colágeno III (μm^2 /campo) em cada foto. Este programa relaciona as porcentagens por área do tecido que foram preenchidos pelo colágeno tipo I e tipo III após coloração com *Picrosirius Red*. Inicialmente foi realizada uma calibração do *software* utilizando uma imagem específica, disponível gratuitamente em <https://ImageJ.nih.gov/ij/download.html>.

Após a calibração as fotomicrografias selecionadas foram submetidas a análises individuais para colágeno tipo I e tipo III através da opção *Split Channel* e análise pelo

Threshold para ajustar as imagens de cada grupo em um mesmo padrão. Os resultados foram, posteriormente, plotados no software *GraphPad Prism 6.0*, para análises estatísticas não paramétricas (*Dunn's Multiple Comparison*).

3.6 Teste de degradação da rP21 pelas proteases do soro de camundongo

3.6.1 Degradação proteica

Para avaliar se a rP21 sofre degradação proteica pelas proteases presentes no soro de animais realizamos uma incubação tempo dependente da proteína com o soro de camundongo C57BL/6, jovem, saudável e não imune. Para isso 10µg de rP21 foram incubados com 10µl de soro e incubados por 0h, 1h, 3h, 6h, 9h, 12h e 24h, em estufa a 37°C, com a parada da reação através da adição de 30µL de tampão de amostra de eletroforese (SC 24945) (1:1), após o tempo de interesse, aquecidos a 100°C por cinco minutos. As amostras foram então aplicadas em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (Laemmli, 1970) e observada com coloração por *Coomassie Brilliant Blue*. Foram realizados 4 experimentos independentes.

Os géis foram então escaneados e analisados a densitometria através do *software ImageJ* com o uso das ferramentas *Analyse*, *Gels* e *Plot Lanes*. Os resultados foram plotados no GraphPad, com análises estatísticas não paramétricas, pelo teste *Dunn's Multiple Comparison*.

3.6.2 Ensaio de fagocitose de partículas de zimosan

Macrófagos de linhagem imortalizados de medula de C57BL/6 WT foram ressuspensos em meio DMEM completo e plaqueados em placas de 12 poços contendo lamínulas circulares, na ordem de 2×10^5 células/poço por 18 horas. Para análise do processo inespecífico de fagocitose induzido por rP21, adicionou-se aos poços partículas de zimosan, na ordem de 20 partículas/célula, totalizando-se 4×10^6 /poço. As células foram tratadas com 40µg/ml da proteína rP21 (Dos Santos *et al.*, 2014), diluídas com 10µL de soro de camundongo não imune, conforme 3.4.1, nos tempos de 0h, 3h, 6h, e 24h horas, intervalos escolhidos em função dos resultados obtidos em 3.4.1. Um grupo de células foi incubado somente com as partículas de zimosan

(grupo controle), de forma que as demais foram incubadas com as partículas e concomitantemente com a proteína.

Ao final de 1 hora de incubação, as lamínulas foram retiradas das placas de cultura e fixadas com *Bouin*, por 15 minutos, e posteriormente coradas com *Giemsa* por 30 minutos. Para a retirada do excesso de corante, as lamínulas foram passadas em soluções contendo xilol e acetona, iniciando em solução de acetona pura e aumentando gradativamente a proporção de xilol até finalizar em solução pura deste composto.

As lamínulas foram coladas com meio de montagem *permount* em laminas de vidro para posterior leitura em microscópio ótico. Quantificou-se o número de partículas de zimozan internalizadas em um total de 200 células por lamínula, em quintuplicata. Os resultados foram plotados no GraphPad, com análises estatísticas não paramétricas (*Dunn's Multiple Comparison*).

4 Resultados

4.1 Purificação e caracterização da proteína rP21

Utilizando o protocolo de purificação da proteína recombinante rP21 descrito por Silva et.al., 2009 e Santos et.al., 2014, foram obtidos 3 mililitros de solução com rP21. Após dosagem no *Nanodrop*, a concentração da solução estoque foi de 5,95 mg/ml.

25 µg da amostra purificada foi aplicada em gel de eletroforese 12% (Laemmli, 1970) seguida de coloração com *Coomassie Brilliant Blue*, para confirmação da sua presença e pureza (**Figura 2**). A imagem foi escaneada no scanner *HP Scanjet G4050* através da inversão de cores pelo programa *HP Photosmart Premier*. Como controle do experimento foi utilizado um marcador de peso molecular de proteínas (PM), PS-101 (*Jena Bioscience GmbH*). No poço aplicado a solução da rP21 observamos a presença de uma única forte banda proteica próximo a 18kDa, indicando a pureza da amostra rP21 obtida.

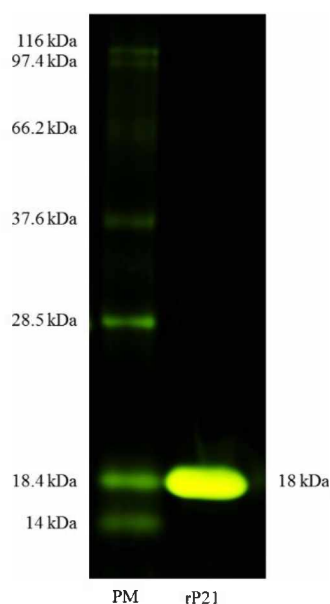


Figura 2 – Pureza da proteína recombinante rP21. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% da proteína rP21. Forte banda próximo a marcação da proteína de mioglobulina de 18,4kDa ilustrando a presença e pureza da proteína em estudo, com peso de aproximadamente 18kDa. Imagem obtida com inversão de cores pelo programa *HP Photosmart Premier*.

4.2 Titulação por ELISA do soro anti-rP21 e especificidade do soro por *Western Blotting*

Após a purificação da proteína rP21 foi realizada a imunização do coelho para a obtenção do soro de coelho anti- rP21. O soro obtido foi analisado quanto ao reconhecimento da proteína rP21 pelo anticorpo policlonal através do teste ELISA, para obtenção do título de anticorpo a ser utilizado, e pelo *Western Blotting*, para demonstrar a especificidade do anticorpo pela proteína rP21. O teste ELISA foi realizado com o soro nas diluições de 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, diluídos em PBS com 10% de SFB (**Figura 3**) utilizando rP21 a quantidade de 5µg/poço.

Os resultados mostraram que o anticorpo obtido foi capaz de detectar a proteína rP21 (antígeno) até a diluição de 1:400, com I.E próximo a 13, e as outras diluições inferiores testadas tiveram densidades ópticas próximas ao controle negativo e PBS. Como controle negativo foram utilizadas amostras de soro não imune. Entretanto, consideramos para uso, em nossos próximos ensaios, a titulação na diluição de 1:200 por apresentar melhor marcação e ser a mais diluída entre as outras diluições com alto índice ELISA, com IE de 133,8. Isso porque as metodologias empregadas são compostas de várias fases e etapas, lavagens e diluições, podendo precisar de uma maior concentração de anticorpos para um resultado confiável. E assim trabalhamos com a máxima diluição com um ótimo IE.

Através do *Western Blotting* foi possível demonstrar a especificidade do anticorpo policlonal de coelho anti-rP21 pois o mesmo confirmou a presença da proteína rP21 na membrana de nitrocelulose e não se ligou na proteína BSA, usada como controle de ligação. Observa-se que a quantidade de proteína detectável é muito semelhante com o perfil que a mesma apresenta na eletroforese SDS-PAGE (25µg)

Assim, com os resultados dos testes sorológicos, observamos a especificidade do soro de coelho produzido, contendo anticorpos policlonais anti-proteína recombinante rP21, baseada na forma nativa secretada pelo protozoário *T. cruzi*.

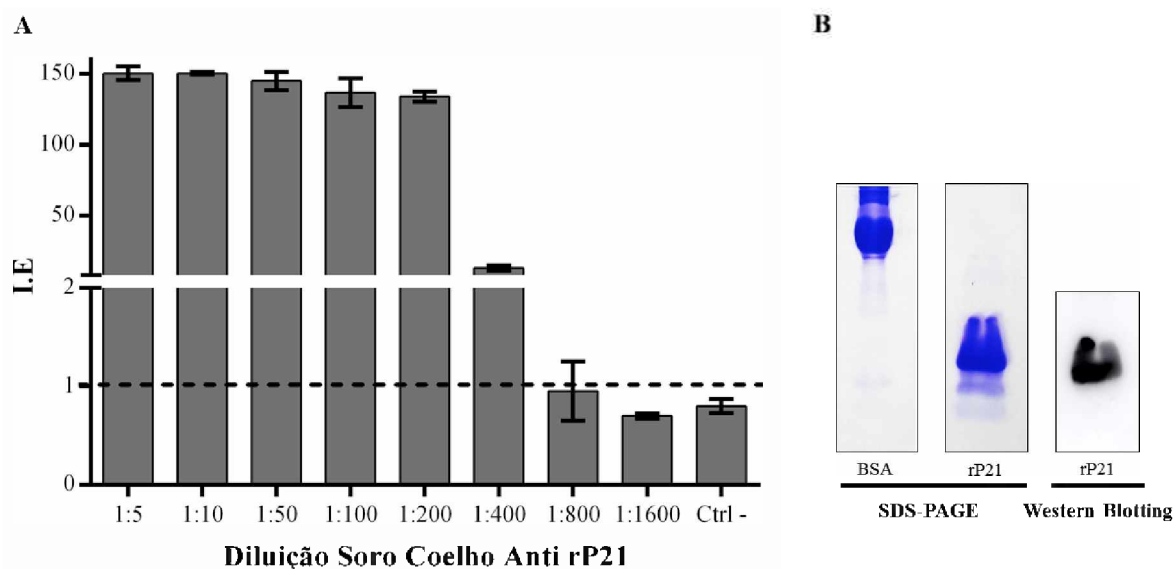


Figura 3 – (A) Determinação do título do soro policlonal de coelho anti-rP21. (B) SDS-PAGE 12% e especificidade do soro policlonal anti-rP21. A titulação do soro anti-rP21 foi determinado por ELISA e a especificidade foi analisada por *Western Blotting*. Foi observado que na diluição de 1:200 o soro apresenta alto índice Elisa (IE=133,8) e é a mais diluída entre as outras diluições com alto IE. As amostras positivas quando IE > 1. O soro policlonal de coelho reagiu de forma específica contra a proteína rP21 por *Western Blotting*, e não foi observada reatividade com BSA. SDS-PAGE 12% com 25 µg de rP21. Média +/- (Desvio Padrão).

4.3 Distribuição da proteína rP21 nos tecidos dos animais tratados e as atividades biológicas

Após 72 horas de inoculação da proteína rP21 foi realizado a coleta dos órgãos dos animais (coração, estômago, esôfago, intestino grosso, fígado, baço e rins) e realizado a análise por RIFI da distribuição da proteína pelos órgãos, utilizando o anticorpo anti-rP21 produzido em coelho. A coleta de urina, fezes e sangue de todos os animais foi realizada para realização das análises por ELISA para observar se a proteína foi metabolizada pelo organismo ou se a mesma estava presente nas amostras analisadas. Além disso, foram avaliados os efeitos biológicos da proteína, como capacidade de alterações histopatológicas e produção de colágeno nos tecidos.

4.3.1 Detecção, por ELISA, da proteína rP21 no soro dos animais tratados

Após 72 horas de inoculação de rP21 os resultados mostraram que a proteína não foi detectável nas fezes e urinas dos animais tratados, entretanto estava presente no soro dos

camundongos tratados via subcutânea com as maiores concentrações testadas (50 e 200µg), indicando sua distribuição pela via sanguínea dos animais (**Figura 4**).

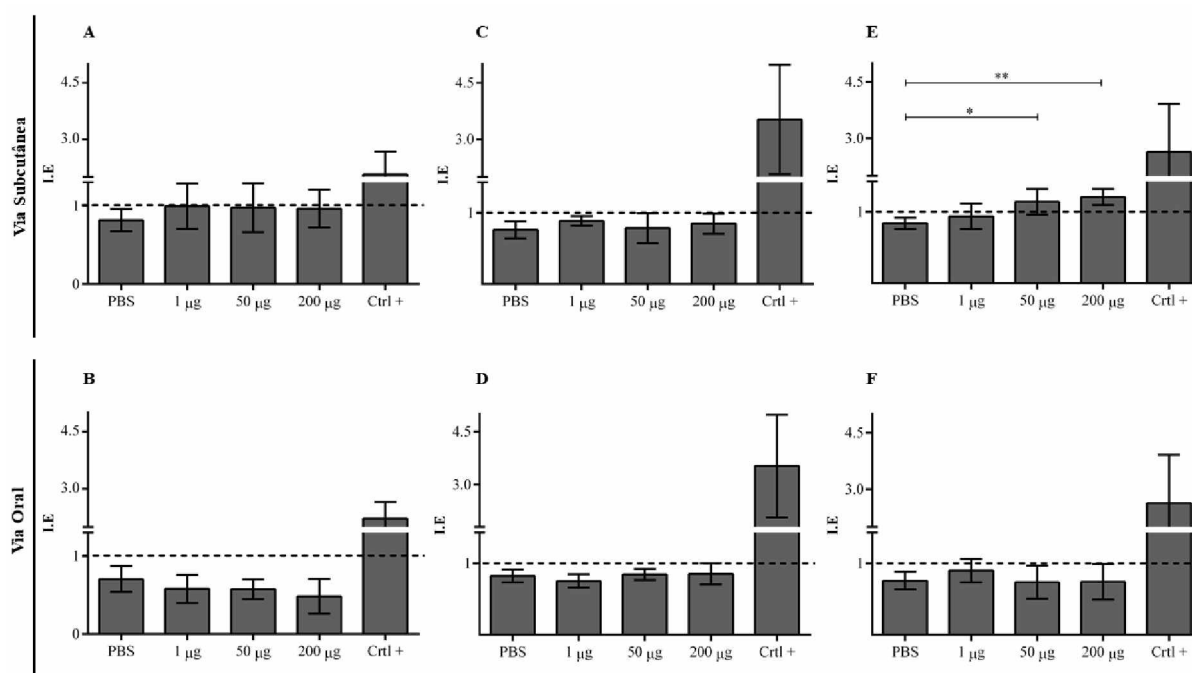


Figura 4 – Presença de rP21 no soro dos animais tratados pela via subcutânea. A proteína foi avaliada nas fezes (A – B), urina (C – D) e no soro (E – F) dos camundongos tratados por via subcutânea e oral em diferentes concentrações por meio da técnica de Elisa. A partir dessa análise foi detectada somente no soro do grupo tratado pela via subcutânea com 50µg e 200µg de rP21 (E), com IE=1,1 e IE=1.14, respectivamente. Como controle positivo foi usado 5µg de rP21 purificada. IE = Índice ELISA (positivo quando > 1). Mediana. * $p < 0,05$ e ** $p < 0.01$.

Entretanto a detecção da proteína ocorreu de forma bem discreta, com o índice ELISA pouco maior que 1. Sendo semelhante entre as amostras dos animais tratados com 50 e 200µg da proteína rP21, mas com diferença estatística com os animais tratados com PBS (* $p < 0,05$ e ** $p < 0.01$, respectivamente) e abaixo do controle positivo das reações (somente rP21, 5µg por poço).

4.3.2 Localização da rP21 no estômago por Imunofluorescência (RIFI)

Foi realizado ensaio de imunofluorescência para observar se a proteína rP21 se distribuía nos tecidos dos animais saudáveis. Observamos que o estômago apresentou a deposição da proteína quando o mesmo foi analisado por RIFI, utilizando o soro de coelho anti-rP21 (1:200). Este fato ocorre tanto pela administração por via oral como pela via subcutânea

de 200 µg de rP21 quando comparados com os animais tratados com PBS. Entretanto, observamos que após o tratamento por via oral, a proteína é visualizada nas glândulas de absorção estomacais (**Figura 5**), na administração pela via subcutânea, rP21 pode ser observada no epitélio estomacal (**Figura 6**).

Embora verificamos que ocorra distribuição da proteína pelo sistema circulatório (4.3.1), não ocorre deposição da proteína nos outros tecidos, inclusive no coração, órgão alvo para a infecção natural por *T. cruzi*. Além disso, a presença no soro de rP21 não foi suficiente para a deposição da mesma no baço ou rins.

Os animais tratados pela via oral com 200 µg de rP21 apresentam a proteína nas glândulas da mucosa estomacal, indicando que a mesma pode ser absorvida pelo estômago. As setas na **figura 5** indicam a deposição da proteína rP21 no tecido. Esta deposição ficou bem evidente quando visualizamos o tecido em maior aumento (20x), demonstrando claramente a proteína na glândula estomacal (**Figura 5M-N**).

Ao analisarmos as fotomicrografias no *ImageJ* e realizando a análise da quantificação das áreas de imunofluorescência do tecido sobre a área do tecido de cada imagem observou-se que a porcentagem de fluorescência é cerca de 5x maior nos animais tratados com 200µg de proteína do que nos animais tratados com PBS (controle). Em outras concentrações a proteína também pode ser visualizada, entretanto não houve diferença estatística entre os grupos.

O núcleo das células que compõem o estômago é bastante visível ao utilizarmos o DAPI como marcação (**Figura 5A, D, G e J**), demonstrando a integridade dos tecidos do estômago. Quando foi realizado a sobreposição das fotomicrografias com a marcação de DAPI e anticorpo Anti-rP21 (**Figura 5C, F, I, L e M**), foi possível observar como ocorre a deposição da proteína nas glândulas de absorção da mucosa gástrica.

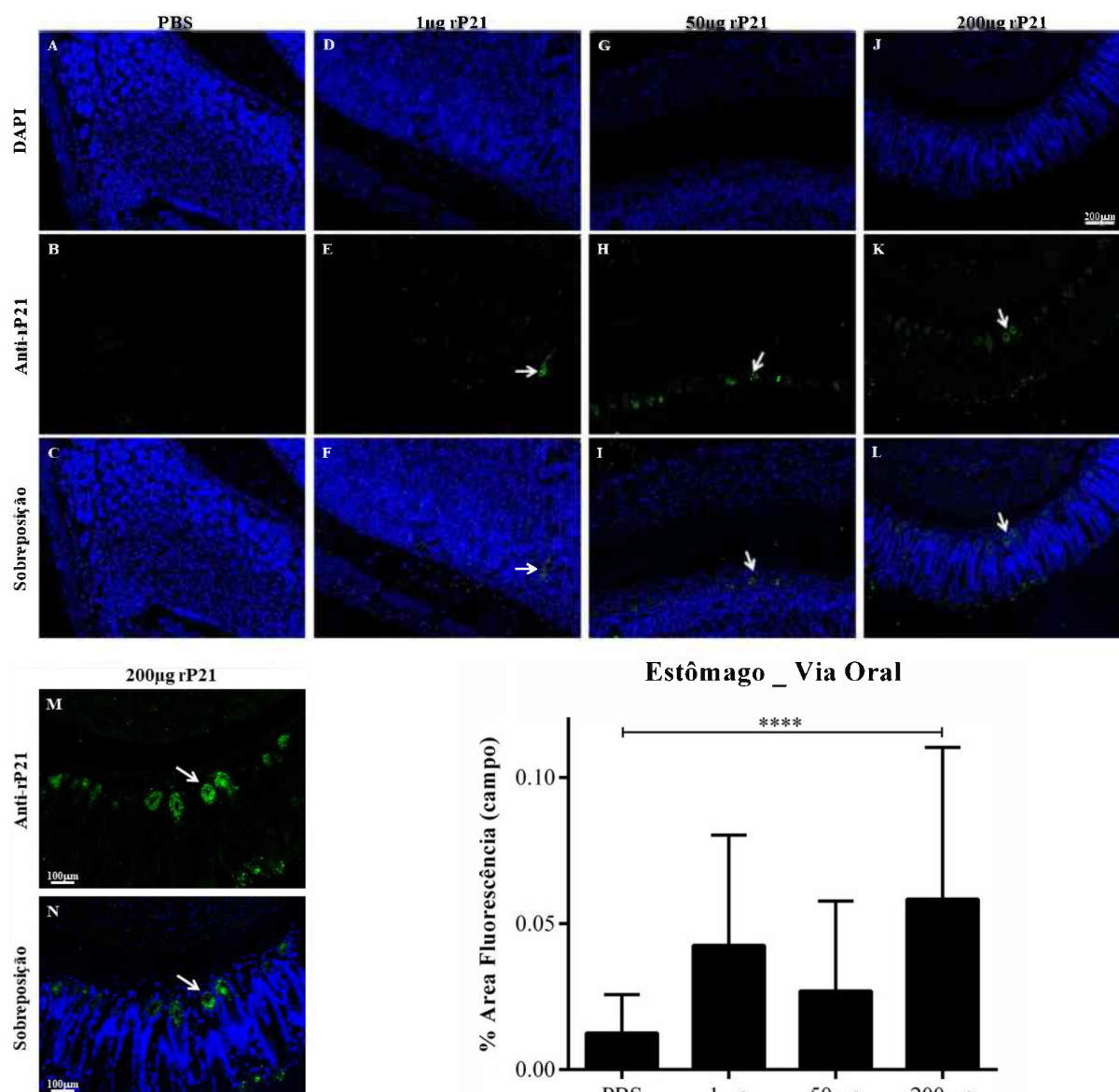


Figura 5 – Deposição da proteína rP21 nas glândulas do estômago após administração oral. Os Animais tratados com 50µg e 200µg de rP21 apresentam a proteína depositada nas glândulas da mucosa gástrica (setas), visível em maior aumento (M, N). RIFI utilizando soro policlonal de coelho anti-rP21 para localização de rP21. Dosando a imunofluorescência do tecido (P) observa-se que a porcentagem é cerca de 5x maior nos animais tratados com 200µg de proteína. Núcleo (DAPI - azul), anti-rP21 (FITC - verde). Animais do grupo controle (A, B e C), animais tratados com 1 µg de rP21 (D, E e F), com 50µg (G, H e I) e com 200µg da proteína (J, K, L, M e N). Média +/- (Desvio Padrão). $P < 0,0001$ (****).

Quando o tratamento ocorre pela via subcutânea com rP21, os animais apresentam a deposição da proteína no tecido epitelial do estômago (Figura 6), indicada pelas setas. Em maior aumento (Figura 6M-N), observa-se que a deposição se restringe ao revestimento estomacal e não no próprio tecido do estômago.

A análise da área de imunofluorescência do tecido pelo *ImageJ* sobre a área do tecido de cada fotomicrografia revela que a porcentagem de fluorescência é 20 vezes maior nos animais tratados com 200µg de proteína do que nos animais tratados com PBS. Nos animais tratados com 50µg e 1µg de rP21, a porcentagem de fluorescência foi 7 vezes maior do que os animais controle (**** $p < 0,0001$). A análise da quantificação das áreas de imunofluorescência dos órgãos foi realizada somente com as fotomicrografias obtidas da revelação com o anticorpo secundário conjugado com FITC. O uso do conjugado TRITC foi somente realizada para a confirmação da fluorescência dos tecidos. Como foi obtido boas fotomicrografias com essa marcação a mesma foi utilizada somente como ilustração na **Figura 6**.

Assim como na administração oral, as fotomicrografias analisadas com o estômago dos animais tratados pela via subcutânea, é possível visualizar os núcleos das células que compõem o estômago ao utilizarmos o DAPI como marcação (**Figura 6A, D, G e J**), demonstrando a integridade dos tecidos do estômago. Quando é realizado a sobreposição das fotomicrografias com a marcação de DAPI e anticorpo Anti-rP21 (**Figura 5C, F, I, L e M**), é possível observar que a deposição da proteína ocorre no tecido epitelial que reveste o estômago.

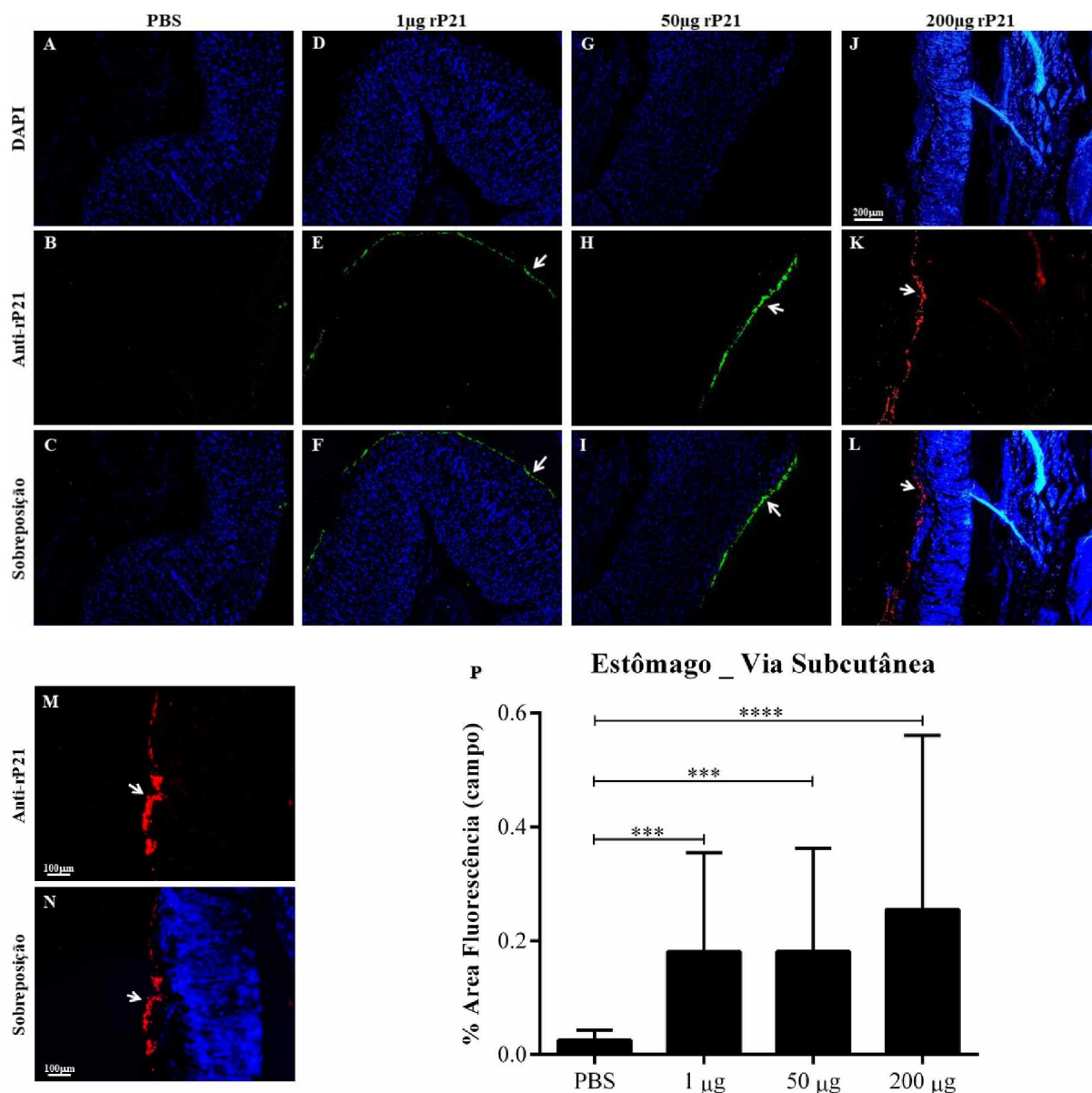


Figura 6 – Depósito da proteína rP21 no tecido epitelial do estômago. O tratamento pela via subcutânea com 200µg rP21 pode ser visualizada pelas setas que indicam a grande deposição da proteína no tecido que reveste o estômago. RIFI utilizando soro de coelho anti-rP21 permite a visualização de grande quantidade de proteína no revestimento do estômago. A porcentagem de fluorescência nesses animais foi 20x maior do que a observada nos tecidos de animais controles (**P**). Animais do grupo controle (**A, B e C**), animais tratados com 1 µg de rP21 (**D, E e F**), com 50µg (**G, H e I**) e com 200µg da proteína (**J, K, L, M e N**). Núcleo (DAPI - azul), rP21 (FITC – verde ou TRITC – vermelho). Média +/- (Desvio Padrão). **** p < 0,0001, *** p = 0,0003.

4.3.3 Análise histopatológica dos tecidos dos animais

As alterações histopatológicas nos órgãos dos animais tratados com rP21 em diferentes concentrações, bem como os respectivos grupos controles, foram examinadas por H.E e observou-se que não há alteração expressiva na população de células do sistema imunológico em nenhuma das vias de inoculação (**Tabela 2**). Ocorre uma leve resposta inflamatória em quase todos os tecidos coletados dos animais tratados com 200µg da proteína rP21, tanto na administração oral e subcutânea, em relação aos animais controles, com consequente aumento no infiltrado de leucócitos nos tecidos dos animais tratados com maiores concentrações da proteína.

No estômago e no intestino grosso dos animais tratados com 200µg de rP21 pela via oral e subcutânea essa alteração é um pouco mais evidente, ocorrendo aumento na reação inflamatória nos tecidos (moderada (++)). Ocorre também, nestes mesmos órgãos, um aumento no infiltrado da população de macrófagos e linfócitos, também considerado moderado (++), quando consideramos a média dos animais de cada grupo e em relação aos animais controles. Como vimos anteriormente, ocorre a deposição da proteína rP21 no estômago pela via subcutânea e via oral (4.3.2), e essa deposição poderia influenciar o infiltrado inflamatório. Os resultados foram obtidos como média dos animais de cada grupo.

Todos os outros órgãos analisados, com exceção do coração e do fígado, que não tem alteração, mesmo os que não apresentaram deposição de rP21 visualizada por RIFI, tiveram uma leve reação inflamatória. Apresentando recrutamento leve (+) da população de neutrófilos, macrófagos, linfócitos, na maioria. Assim a rP21 isolada também pode apresentar atividade pró-inflamatória.

Tabela 2 – Análise qualitativa do infiltrado de células nos tecidos dos animais tratados com rP21.

	Oral							Subcutânea						
PBS														
	Fígado	Rim	Intestino Grosso	Esôfago	Estômago	Coração	Baço	Fígado	Rim	Intestino Grosso	Esôfago	Estômago	Coração	Baço
Neutrófilos	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
Macrófagos	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
Linfócitos	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
Plasmócitos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Necrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reação inflamatória	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
1 µg														
Neutrófilos	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
Macrófagos	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Linfócitos	+	+	-	+	+	-	+	+	+	++	+	+	-	++
Plasmócitos	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
Necrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reação inflamatória	+	+	+	-	+	-	+	-	+	++	+	+	-	+
50 µg														
Neutrófilos	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+
Macrófagos	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	++
Linfócitos	+	+	++	+	+	+	+	+	+	++	+	++	+	++
Plasmócitos	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Necrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reação inflamatória	+	+	++	+	+	-	+	+	+	++	+	++	-	++
200 µg														
Neutrófilos	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+
Macrófagos	+	+	++	+	++	+	+	+	+	+	++	++	+	+
Linfócitos	+	+	++	+	++	+	+	+	+	+	++	++	+	++
Plasmócitos	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
Necrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reação inflamatória	+	+	++	-	++	+	+	+	+	++	++	++	-	++

Observa-se que ocorre uma leve resposta inflamatória em quase todos os tecidos coletados dos animais tratados com 200µg da proteína rP21, tanto na administração oral e subcutânea, em relação aos animais controles, com consequente aumento no infiltrado de macrófagos e linfócitos nos tecidos dos animais tratados com maiores concentrações da proteína, principalmente no estômago e no intestino grosso. (-) ausente, (+) leve, (++) moderada e (+++) intensa.

Os resultados ilustrados na **tabela 2** são relativos à média dos animais de cada grupo. Quando foi realizada a análise das lâminas, foi considerado como representativo a maior quantidade de resultados que se repetiam dentro de cada grupo. Assim, em cada seis animais, o resultado considerado era aquele que ocorria em pelo menos 4 animais do grupo.

4.3.4 A proteína rP21 influencia na análise morfométrica de colágeno presente no estômago

A diferenciação de colágeno tipo I e colágeno tipo III pode ser medida através de imagens produzidas a partir do uso de filtro de polarização em microscópio. No presente trabalho as imagens foram obtidas de cortes histológicos corados com *Picrosirius Red* de animais tratados com a proteína recombinante rP21 pela via oral e via subcutânea (200µl) com dosagens de 1µg, 50µg e 200µg e com grupo controle tratado com PBS.

O colágeno avaliado no estômago após administração por via oral da proteína rP21 (**Figura 7A – 7F**) apontou que 1,7% de área dos cortes histológicos analisados no *ImageJ* são preenchidos com colágeno tipo I nos animais controle (**Figura 7A**). Após tratamento com 50 e 200µg de proteína rP21 esses valores atingem 1,3% e 1,4% área. O mesmo ocorre para o colágeno tipo III (**Figura 7B**) que nos animais tratados com PBS, apresentaram 1,8% de área com colágeno e foram obtidos 1,8%, 0,9% e 1,3% nos grupos 1µg, 50µg e 200µg.

As fotomicrografias da **figura 7** ilustram o que foi medido pelo *ImageJ*. Não ocorre alteração visual na quantidade de colágeno, embora haja grande deposição dessa proteína principalmente no tecido conjuntivo que compõe o estômago.

No estômago após a inoculação pela via subcutânea (**Figura 7G – 7L**), a quantidade de colágeno tipo I (1,0%) e colágeno tipo III (0,8%) foram semelhantes nos animais controle, enquanto que nos grupos 1µg, 50µg e 200µg o tratamento para colágeno tipo I (**Figura 7G**) apontou as porcentagens de 0,8%, 0,9% e 2,9% nos grupos 1µg, 50µg e 200µg, sendo este último quase o triplo da porcentagem dos animais controle.

Para colágeno tipo III ((**Figura 7H**) as porcentagens obtidas foram de 0,6% quando administramos 1µg, 0,5% no grupo com 50µg e 1,7% no de 200µg, novamente superior ao grupo controle (0,8%). Através das análises estatísticas, observamos que pela via subcutânea houve diferença estatística entre o PBS e tratado com 200µg de proteína, sugerindo que a rP21

influenciou sim na diferenciação de colágeno tipo I e tipo III neste tecido e por esta via de administração da proteína.

As fotomicrografias, 7I, 7J, 7K e 7L, ilustram essa diferença na quantidade de colágeno. Sendo bastante evidente na fotomicrografia 7L, preenchendo quase todo o tecido conjuntivo do estômago.

Em relação aos outros tecidos coletados e analisados, observou-se que não há a diferenciação de colágeno tipo I e colágeno tipo III após diferentes tratamentos com a proteína recombinante rP21 por via oral e via subcutânea, ocorrendo a deposição do colágeno principalmente no tecido que reveste a parede dos vasos sanguíneos e linfáticos (endotélio). No estômago (**Figura 7**), esôfago e intestino grosso (**Figura 8**), a distribuição das fibras de colágeno tipo I e tipo III foram bem visualizadas também no tecido conjuntivo de cada órgão e no epitélio de absorção dos tecidos.

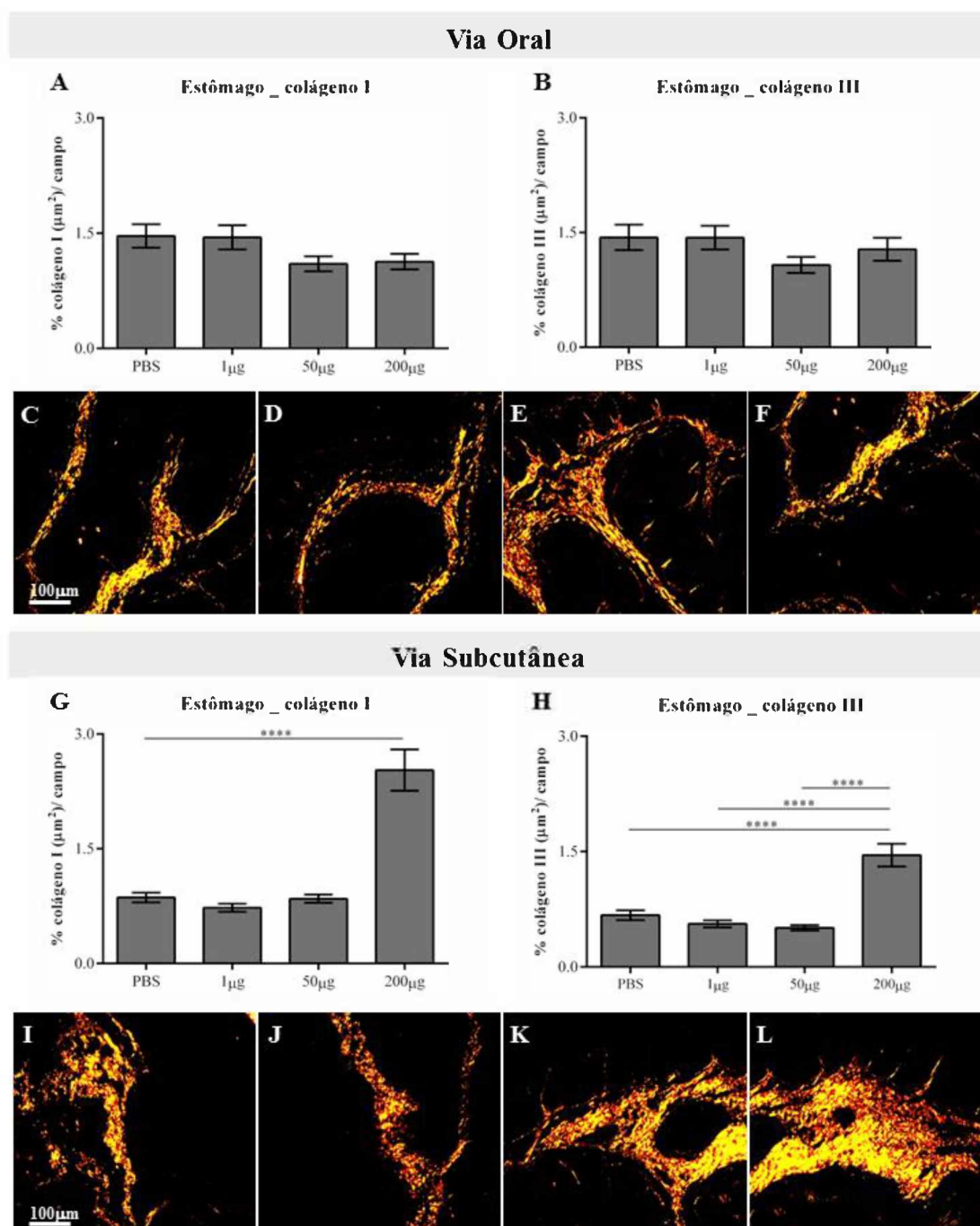


Figura 7 - Proteína recombinante rP21 altera a quantidade de colágeno tipo I no tecido conjuntivo do estômago após administração via subcutânea. Análises gráficas da dosagem de colágeno tipo I (A, G) e do colágeno tipo III (B, H) obtidas com o *ImageJ*. Fotomicrografias da diferenciação de colágeno tipo I e tipo III após tratamento por via oral (C, D, F e G) e tratamento por via subcutânea (I, J, K e L) com PBS, e com 1μg, 50μg e 200μg da proteína recombinante rP21, respectivamente. Cortes foram corados com *Picrosirius Red*. Fotomicrografias observadas em microscópio invertido com luz polarizada. **** $p < 0,0001$.

O esôfago é um órgão composto por grande quantidade de tecido epitelial, conjuntivo e tecido muscular e as análises das imagens dos animais tratados por via oral (**Figura 8A-B**)

apontaram que o percentual de área ocupada por colágeno tipo I foi de 1,1% no grupo tratado com PBS, não tendo alterações estatísticas nos tratamentos com rP21. No colágeno tipo III o tratamento teve a porcentagem de 0,7% área no grupo com PBS, e sobe para 1,1% área no grupo tratado com 200µg, apontando porcentagens similares nos outros grupos.

Ao analisar o esôfago após o tratamento por via subcutânea (**Figura 8G-H**), observamos que o órgão apresentou quantidade semelhante de colágeno tipo I (1,0%) e colágeno tipo III (0,8%) nos animais controle, enquanto que nos grupos 1µg, 50µg e 200µg o tratamento para colágeno tipo I apontou 1,3%, 1,0% e 1,6%. Após tratamento para colágeno tipo III foram alcançados os percentuais de 0,7%, 0,48% e 0,8% nos grupos 1µg, 50µg e 200µg, sem diferenças estatísticas entre eles.

Avaliando o percentual de colágeno obtido após administração da proteína no intestino grosso (**Figura 8**), os resultados apontaram uma quantidade mais elevada de colágeno tipo I do que do colágeno tipo III confirmando a maior incidência desse colágeno no organismo. A distribuição das fibras de colágeno tipo I e tipo III foi bem visualizada no tecido conjuntivo que envolve as vilosidades do intestino.

O tratamento por via oral (**Figura 8M-R**) indicou o percentual do intestino grosso que varia entre 0,6% e 0,9% para colágeno tipo I entre todos os animais enquanto que os resultados para o colágeno tipo III variaram de 0,4% a 0,6%. No tratamento por via subcutânea (**Figura 8S-X**) os resultados foram similares aos obtidos por via oral, porém no grupo tratado com 200µg alcançou 0,9% para colágeno tipo I e 0,7% para colágeno tipo III. Estes resultados não apresentaram diferenças quando analisados nos testes estatísticos.

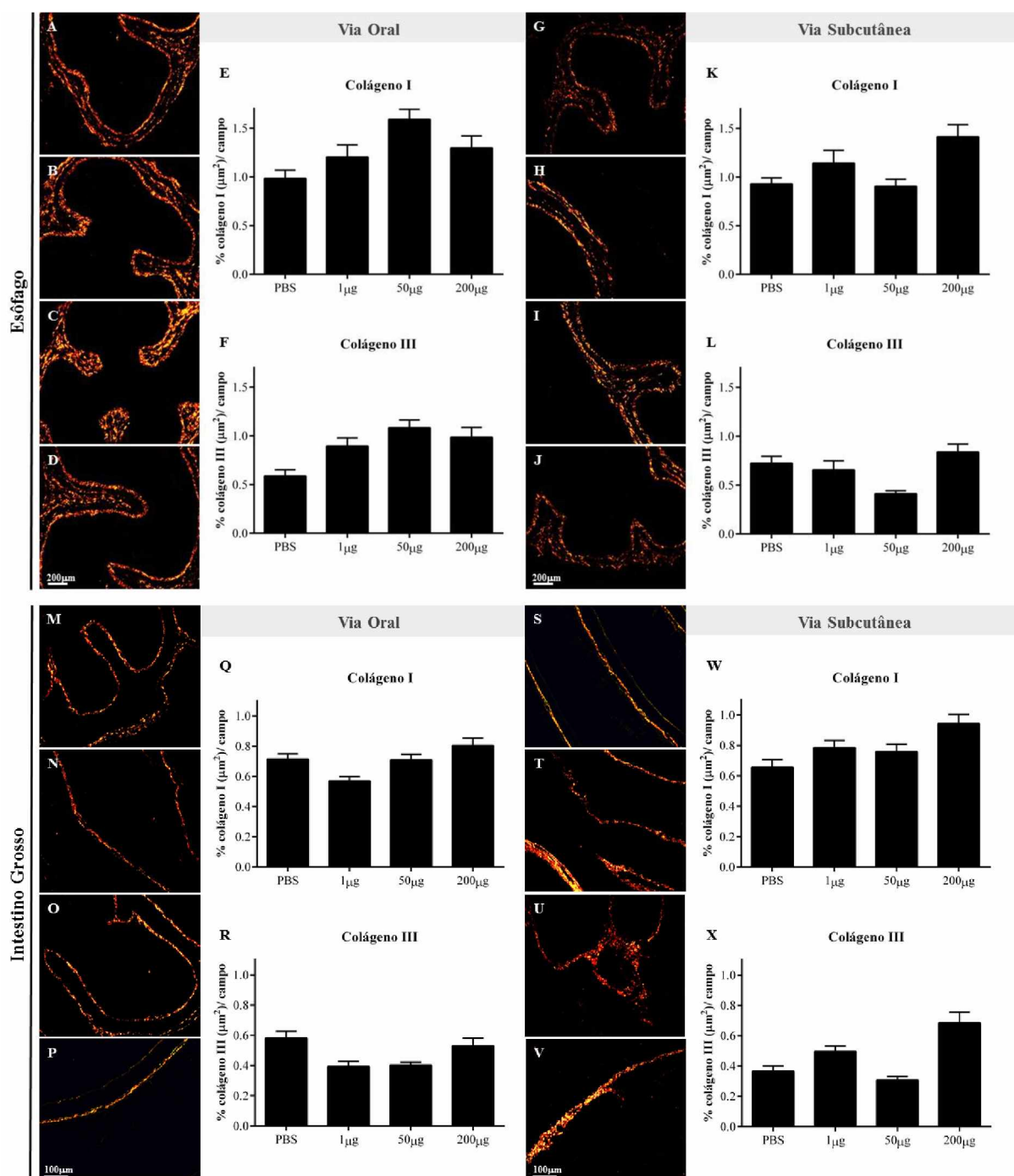


Figura 8 – Proteína recombinante rP21 não altera a quantidade de colágeno tipo I e III no esôfago e intestino grosso. Análise do tratamento com proteína recombinante rP21 pela via oral (A-F / M-R) e via subcutânea (G-L / S-X) do esôfago (A-L) e do intestino grosso (M-X), respectivamente. Barras representam análises estatísticas da porcentagem de colágeno obtidas em *ImageJ*. Fotomicrografias representativas dos tecidos dos animais do grupo controle e dos animais tratados com diferentes concentrações de proteínas (1 μg , 50 μg e 200 μg) pela via oral (A, B, C e D / M, N, O e P) e pela via subcutânea (G, H, I e J / S, T, U e V), observadas em microscópio invertido com luz polarizada, corados com *Picrosirius Red*.

No fígado, o tratamento realizado com administração da proteína recombinante por via oral (**Figura 9A-F**) obteve o percentual de diferenciação de colágeno tipo I de 0,9% área no

grupo PBS, 0,7% área no grupo 1 μ g, 1,1% área no grupo 50 μ g e 1,0% área no grupo 200 μ g. Enquanto que a diferenciação de colágeno tipo III apresentou 0,8%, 0,5%, 0,7% e 0,8% nos tratamentos com PBS, 1 μ g, 50 μ g e 200 μ g, respectivamente.

Após o tratamento por via subcutânea (**Figura 9G-L**) o percentual de diferenciação no fígado para colágeno tipo I foi de 0,6% área no grupo PBS e 0,7%, 0,65% e 0,59% nos tratamentos com a proteína rP21 (1, 50 e 200 μ g). Apresentou também o percentual de diferenciação do colágeno tipo III de 0,39% área no grupo PBS, 0,5% área no grupo 1 μ g, 0,47% área no grupo 50 μ g e 0,37% área no grupo 200 μ g.

Nas fotomicrografias obtidas após a coloração e analisadas sob luz polarizada destacam-se os colágenos tipo I e tipo III envolvendo os vasos sanguíneos ou os capilares sinusoidais do fígado. No baço foram evitadas as áreas do hilo esplênico pois é uma área muito rica em vasos sanguíneos e poderiam interferir nos resultados da porcentagem de colágeno.

No baço (**Figura 9M-X**), o tratamento via oral apresentou um percentual para área ocupada por colágeno tipo I de 0,38% nos grupos PBS e 1 μ g, 0,37% no grupo 50 μ g e 0,55% no grupo de 200 μ g sendo que a área para o colágeno tipo III alcançou 0,19% no grupo PBS, 0,28% no tratamento de 1 μ g, 0,17% com 50 μ g e 0,3% no grupo de 200 μ g. Pela via subcutânea o colágeno tipo I demonstrou a área de 0,45% no grupos PBS, 0,4% no de 1 μ g, 0,42% no grupo 50 μ g e 0,5% no de 200 μ g, porém apesar da aparente diferença entre o último grupo e os demais o resultado não apontou significado estatístico. No tratamento pela via subcutânea para colágeno tipo III o crescimento percentual ocorreu gradualmente entre os grupos PBS, 1 μ g e 50 μ g apontando áreas de 0,25%, 0,31% e 0,42% e no grupo 200 μ g apresentou um percentual de 0,41%, porém estes resultados não apontam diferença estatística em nenhuma das situações.

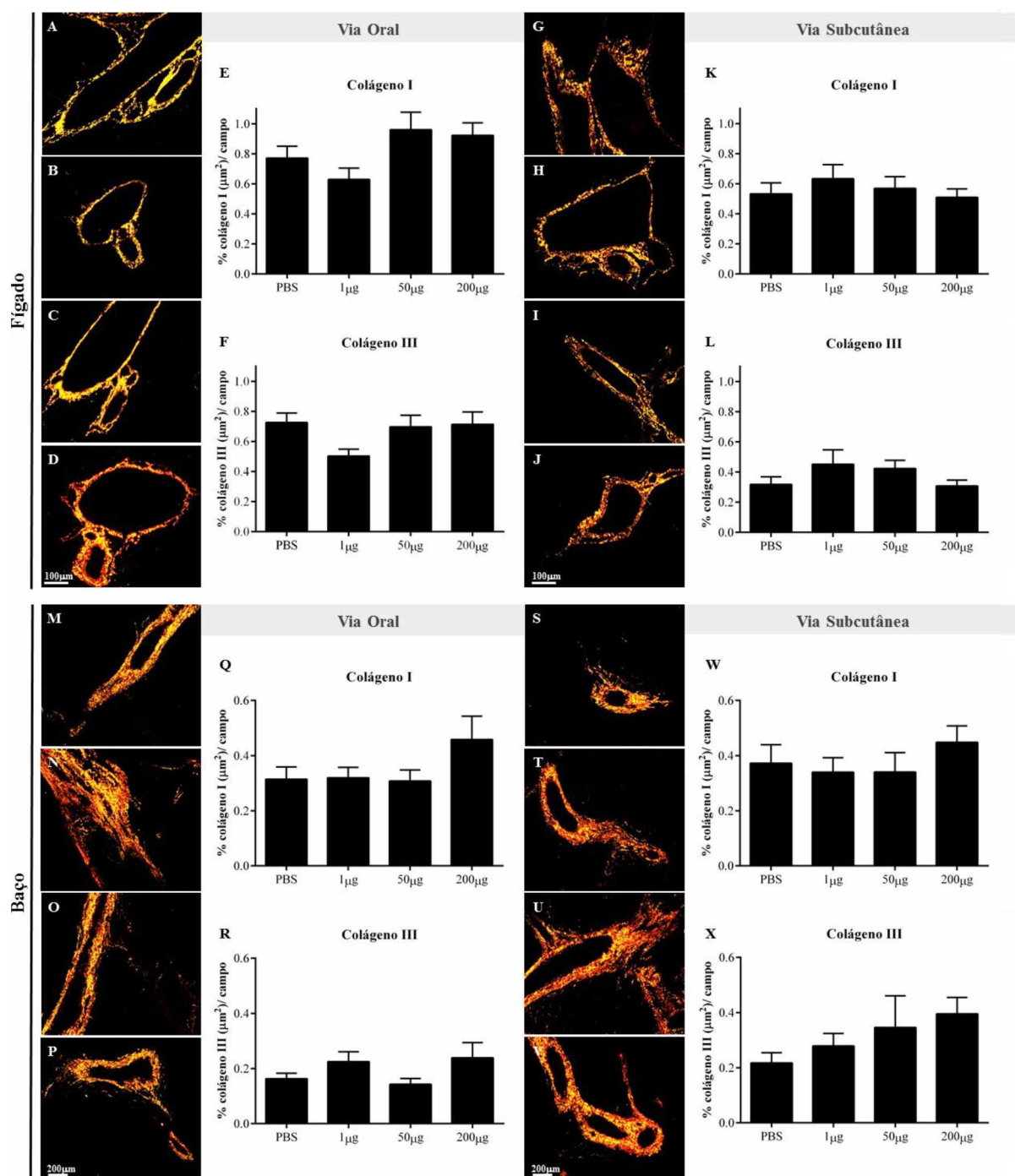


Figura 9 – A quantidade porcentual de colágeno I e III não são alteradas no fígado e no baço dos animais tratados com rP21. Análise do tratamento com proteína recombinante rP21 pela via oral (A-F / M-R) e via subcutânea (G-L / S-X) do fígado e do baço, respectivamente. Cortes foram corados com *Picrosirius Red*. Fotomicrografias representativas dos tecidos dos animais do grupo controle e dos animais tratados com diferentes concentrações de proteínas (1µg, 50µg e 200µg) pela via oral (E, F, G e H / O, P, Q e R) e pela via subcutânea (I, J, K e L / U, V, W e X), observadas em microscópio invertido com luz polarizada.

O resultado da análise porcentual do colágeno nos rins (**Figura 10A-L**) apresentou grande porcentagem de área de colágeno ocupada tanto pelo colágeno tipo I quanto pelo colágeno tipo III. Nos grupos tratados por via oral o colágeno tipo I atingiu a porcentagem de

0,6% de área no grupo PBS e 0,8%, 0,3%, 0,4% área nos grupos 1µg, 50µg e 200µg, enquanto que a área ocupada para o colágeno tipo III foi de 0,5% nos grupos PBS e 1µg, 0,3% no 50µg e 0,3% nos grupos tratados com 200µg.

Com administração pela via subcutânea o grupo tratado com PBS apresentou um percentual de 0,9% área para colágeno tipo I e 0,5% área para o colágeno tipo III nos rins, sem diferença estatística ao ser comparado aos grupos 1µg, 50µg e 200µg que obtiveram percentuais de 0,8%, 0,5% e 0,7% para colágeno tipo I e 0,4%, 0,3% e 0,5% para colágeno tipo III.

Na **Figura 10 (M-X)** também se observa a diferenciação de colágeno tipo I e colágeno tipo III após diferentes tratamentos com a proteína recombinante rP21 por via oral e via subcutânea no coração (**Figura 10M-X**). Em todos os grupos foi observado nas fotomicrografias coletadas que a deposição do colágeno ocorre principalmente revestindo a parede dos vasos sanguíneos cardíacos.

A área percentual para colágeno tipo I ocupada pelo grupo tratado por via oral atingiu 0,17 % área no grupo controle (tratados com PBS), 0,19% área no grupo 1µg, 0,1% área nos animais tratados com 50µg e 0,18% área no grupo 200µg. Embora tenham diferença na porcentagem de área com colágeno a mesma não foi significativa entre os grupos, pois apresentaram semelhança com a porcentagem do grupo controle.

Nas análises do colágeno III o grupo controle apresentou 0,13% de área ocupada, porém tal percentual foi menor nos grupos 1µg e 50µg apresentando 0,12% e 0,09% enquanto que no grupo de 200µg foi encontrado o percentual de 0,14%.

O tratamento por via subcutânea é muito semelhante, com área percentual atingida para colágeno tipo I de 0,18%, 0,1%, 0,06% e 0,16% para os grupos PBS, 1µg, 50µg e 200µg, enquanto que para colágeno tipo III atingiu a porcentagem de 0,09% área no grupo PBS, 0,04% área no grupo 1µg, 0,05% área no grupo 50µg e 0,08% área no grupo 200µg.

Os resultados obtidos após análises estatísticas não apontaram diferença na produção de colágeno pelo tecido muscular esquelético cardíaco após o tratamento por nenhum das vias de inoculação.

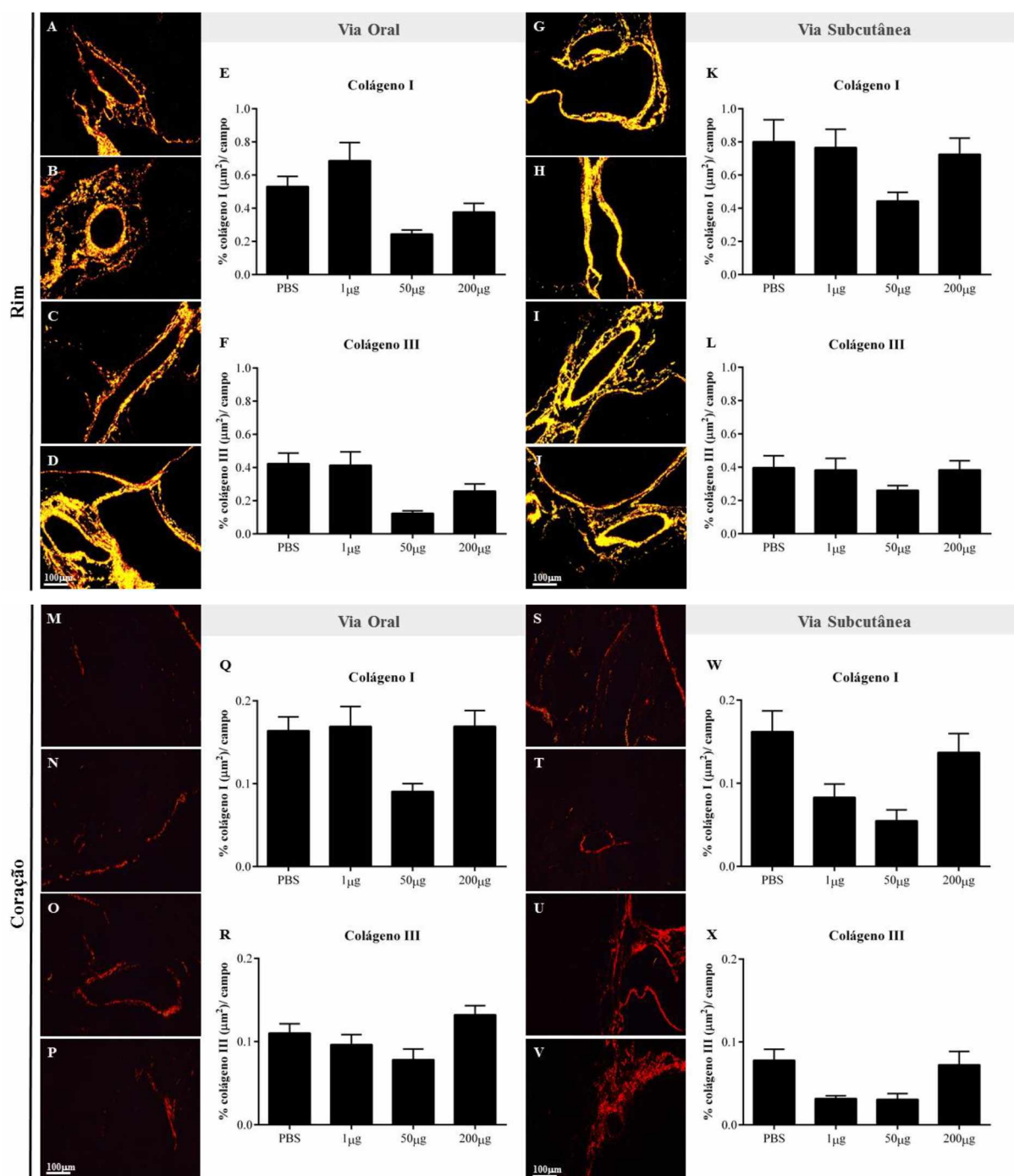


Figura 10 – Proteína rP21 não altera a porcentual de colágeno tipo I e III no rim e no coração. Porcentual da quantidade de colágeno nos rins (E-F / K-L) e no coração (Q-R / W-X) após tratamento com proteína recombinante rP21 pela via oral e pela via subcutânea, respectivamente. Fotomicrografias representativas dos tecidos dos animais do grupo controle (PBS) e dos animais tratados com diferentes concentrações de proteínas (1 μg , 50 μg e 200 μg) pela via oral (A, B, C e D / M, N, O e P) e pela via subcutânea (G, H, K e L / S, T, U e V), coradas com *Picrosirius Red*. Observação em microscópio invertido com luz polarizada.

4.4 A proteína rP21 mantém estabilidade quando incubada com soro de camundongos e não perde atividade pró-fagocítica

A proteína rP21 foi incubada com o soro de camundongo C57BL/6, jovem, hígado e não imune e manteve estabilidade frente as proteases presentes no mesmo (**Figura 11**). Observamos que a proteína provavelmente sofre ação na sua cauda de histidina, diminuindo levemente seu peso molecular já na primeira hora de tratamento (**Figura 11A**), entretanto, se mantém presente mesmo após 24 de incubação com o soro do camundongo.

Apesar de uma leve queda na marcação proteica da rP21 após 6 horas de incubação, com a análise da densitometria do gel (três experimentos independentes, com amostras diferentes e em dias alternados) não houve diferença estatística (**Figura 11B**), demonstrando a estabilidade da proteína frente as proteases presentes no soro de animais.

A diminuição no tamanho da proteína rP21 observada no gel SDS-PAGE pode ser devido à quebra na cauda de histidina que compõe a proteína recombinante. A cauda de histidina é relativamente pequena e não interfere nas propriedades da proteína.

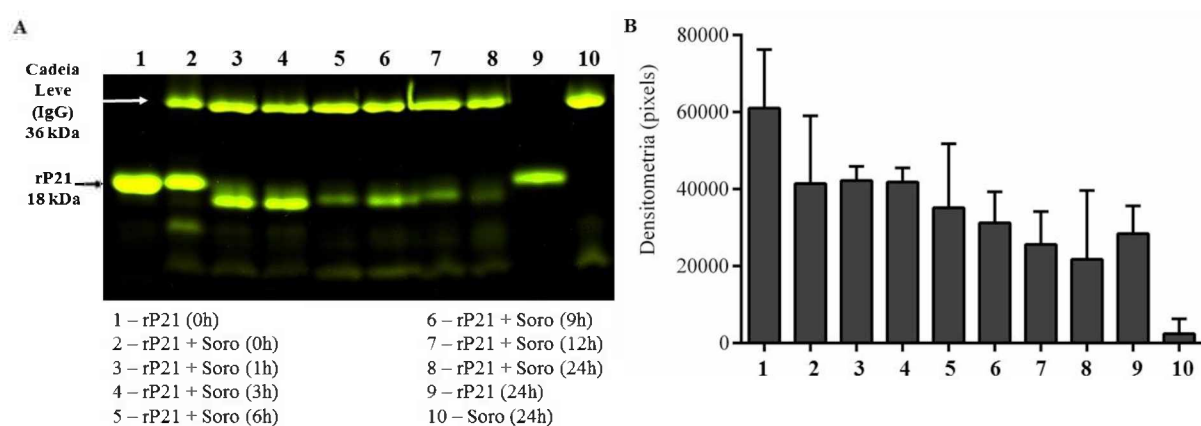


Figura 11 – Estabilidade da proteína rP21 frente as proteases do soro de camundongo. (A) Eletroforese *SDS-PAGE* ilustrando a proteína rP21 (10 μ g) perdendo, provavelmente, a cauda de histidina já na primeira hora de incubação, mas se mantendo presente até 24 horas de tratamento com soro de camundongo jovem e não imune (coluna 8). A presença da cadeia leve da IgG, ilustra a quantidade igual de soro incubado. (B) densitometria de três diferentes géis *SDS-PAGE* do tratamento rP21 e soro. Média $\pm$ (Desvio Padrão). Imagem obtida com inversão de cores pelo programa *HP Photosmart Premier*.

A manutenção da atividade proteica da rP21 foi analisada com ensaio de fagocitose de partículas de zimozan por macrófagos imortalizados de medula de C57BL/6 WT (**Figura 12**).

Após incubação da proteína com o soro de animais jovens foi observado que a quantidade de partículas de zimozan internalizadas na presença de rP21 (**Figura 12B**) foi praticamente o dobro em relação aos macrófagos incubados somente com zimozan (**Figura 12A**), confirmando sua atividade pró-fagocítica. O mesmo ocorre após incubação somente com soro (**Figura 12G**). Fato esperado, pois, o soro contém anticorpos e os macrófagos apresentam receptores da cadeia constante de anticorpos (FcR). Importante lembrar que todos os macrófagos sofreram pré-tratamento com soro por 30 min antes da incubação com a proteína rP21 + soro + zimozan.

Assim, conforme esperado, também foi observado que a associação de rP21 e soro aumenta muito a quantidade de partículas de zimozan internalizadas pelos macrófagos em comparação com células incubadas somente com zimozan (**** $p < 0,0001$) (**Figura 12I**). Na associação rP21 + soro 0h + zimozan a quantidade de partículas de zimozan contabilizadas atingiram uma média de 679 partículas fagocitadas em 200 células contadas (**Figura 12C**), e se mantendo na casa de 500 partículas mesmo após a proteína rP21 ter sido incubada por 24 horas com as proteases do soro dos camundongos (rP21 + soro 24h + zimozan) (**Figura 12F**).

Somente o soro, mantido 24 horas na estufa (**Figura 12H**), também foi analisado para confirmar a ação da proteína rP21 e excluir a possibilidade de contaminantes que poderiam crescer no soro e serem os responsáveis pela estimulação de fagocitose das partículas de zimozan pelos macrófagos. Pela análise da quantidade de partículas internalizadas observamos que mesmo após 24 horas na estufa, somente o soro dos camundongos não altera a quantidade de fagocitose, mantendo o número constante de partículas de zimozan, 366 partículas no soro 0 horas e 316 partículas após 24 horas na estufa.

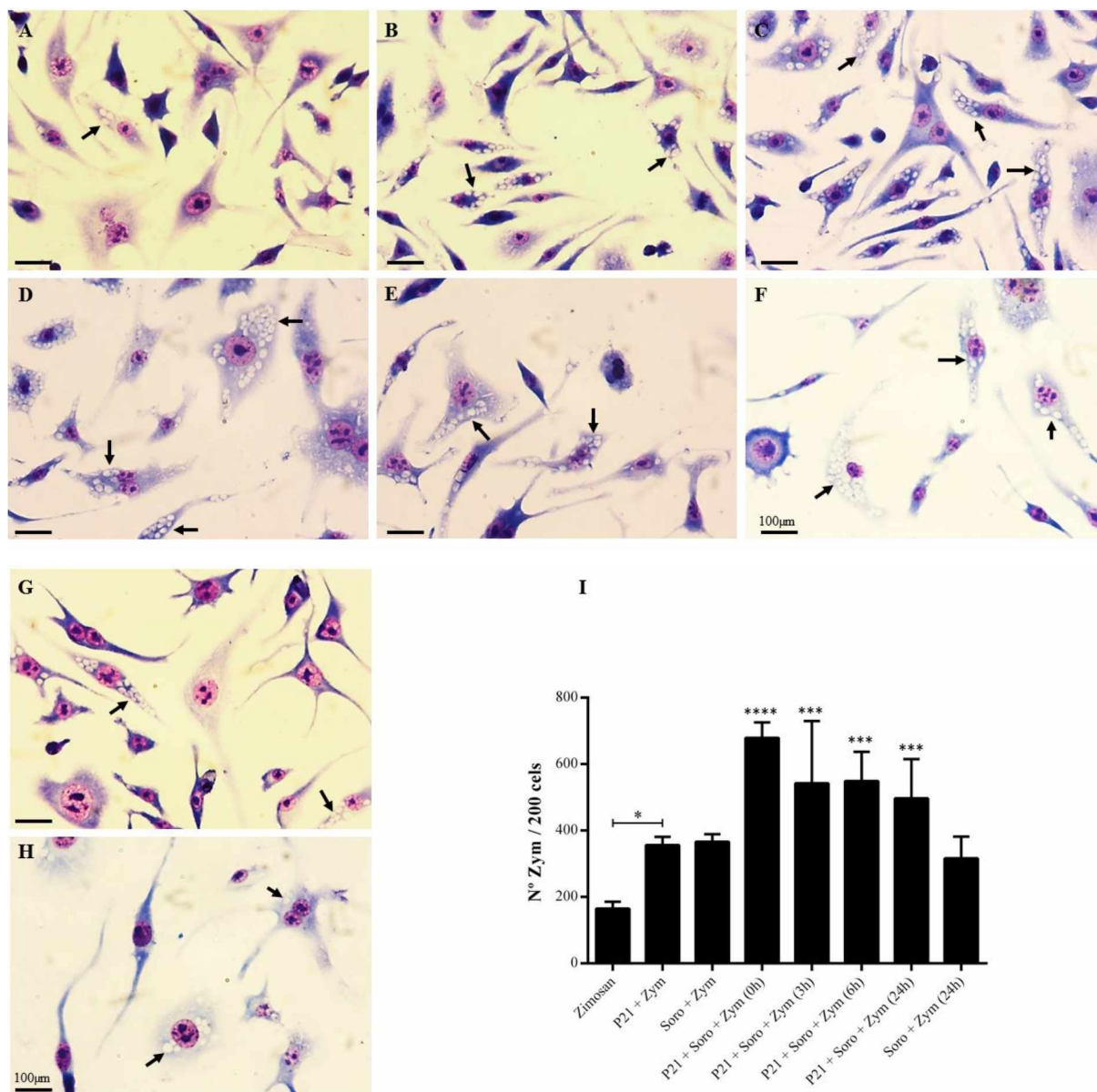


Figura 12 – Atividade pró-fagocítica da rP21 é mantida após tratamento com proteínas do soro. Macrófagos imortalizados de medula de C57BL/6 WT foram incubados com diferentes tratamentos de rP21 (B-F) e de soro de camundongo não imune (G-H) e com partículas de zimosan para avaliação da atividade pró-fagocítica da proteína rP21 por 1 hora. Como controle somente zimosan foi adicionado na cultura de macrófagos (A). A proteína foi previamente mantida em estufa 37°C, sem soro (B), incubada previamente com o soro por diferentes tempos, 0h (C), 3h (D), 6h (E) e 24h (F). O soro também foi mantido em estufa previamente 0h (G) e por 24h (H). Coloração *Giemsa*, observação em microscopia de luz e análise pelo *ImageJ* e *GraphPad* (I). Setas indicam partículas de zimosan internalizadas. Média +/- (Desvio Padrão). **** p < 0,0001, *** p < 0,001, * p < 0,01 (comparados com o controle utilizando somente zimosan).

5 Discussão

Apesar dos avanços no controle do vetor e na qualidade das transfusões de sangue em vários países endêmicos e no controle sanitário de alimentos, a Doença de Chagas permanece como um problema de saúde pública. Cerca de 80% das pessoas atingidas pela doença não tem acesso ao diagnóstico e ao tratamento sistemático, elevando o impacto de morbidade e mortalidade e o custo social da enfermidade (Dias *et al.*, 2016).

No Brasil, devido à quantidade de pessoas infectadas por *T. cruzi*, o governo tem grande papel no desenvolvimento dos campos técnico-científico e político. Não apenas para a prevenção de novos casos, mas, sobretudo, na implementação de melhores decisões e benefícios para os portadores da doença, tanto na fase aguda quanto na crônica.

As populações infectadas se apresentam mais vulneráveis devido a sobreposição a outras doenças e agravos. Além disso, tem menores ações de intervenções preventivas, menor acesso a serviços de saúde e atenção primária, e conseqüentemente, maior probabilidade de desenvolvimento de formas graves da doença podendo evoluir para óbito (Lescure *et al.*, 2010).

São condicionantes sociais para a manutenção do ciclo entre o vetor e o homem as migrações descontroladas, degradação ambiental, alterações climáticas, maior concentração da população em áreas urbanas e a precariedade de condições socioeconômicas (Coura e Dias, 2009). Constituindo uma situação social de vulnerabilidade e negligência.

Tentativas têm sido realizadas nos últimos anos para melhorar o diagnóstico sorológico da Doença de Chagas, envolvendo a criação de métodos confiáveis e acessíveis para a população. Entretanto, a maior dificuldade dos testes sorológicos envolve a reação cruzada com antígenos de *Leishmania* (Longhi *et al.*, 2012; Viol *et al.*, 2012; Abras *et al.*, 2016) e *Trypanosoma rangeli* (Umezawa *et al.*, 1999; Caballero *et al.*, 2007), além da grande variabilidade antigênica que o protozoário apresenta.

Os métodos diagnósticos imunológicos são utilizados na fase crônica da Doença de Chagas devido à baixa parasitemia (Campos *et al.*, 2016). Existem dois tipos de técnicas sorológicas para a detecção de anti - *T. cruzi*. Os testes convencionais usam antígeno de parasita completo e os testes não convencionais são baseados em antígenos recombinantes ou purificados / semi-purificados (Longhi *et al.*, 2012). O uso de proteínas recombinantes proporciona a busca para o aperfeiçoamento do diagnóstico e do tratamento da doença visando a melhoria das condições de vida para pacientes chagásicos.

Uma vez que a P21 é secretada por todas as formas evolutivas, por diferentes cepas de *T. cruzi* e é específica da espécie, não sendo co-relacionada a nenhuma proteína de outra espécie parasitária (Da Silva *et al.*, 2009), a geração de anticorpos contra esta proteína pode ser uma importante ferramenta para ser usado na terapêutica e/ou no diagnóstico da doença.

Neste trabalho, obtivemos anticorpos policlonais de coelho anti-rP21, que foram efetivos e com alta especificidade pela proteína nas reações por ELISA e *Western Blotting* (**Figura 3**). A diluição determinada para o uso do anticorpo policlonal de coelho anti-rP21 foi de 1:200, por apresentar melhor marcação, com IE de 133,8, e não 1:400.

Nesta diluição (1:200), os anticorpos foram utilizados em vários outros experimentos e se mostraram capazes de reconhecer a proteína após a administração da rP21, tanto pela via oral quanto pela via subcutânea (**Figura 5 e 6**). A utilização de anticorpo policlonal anti-P21 pode diminuir a reação cruzada existente em outros métodos que empregam diferentes *pools* de antígenos (Amato Neto *et al.*, 2009; Abras *et al.*, 2016) e ainda oferece uma metodologia confiável e acessível à população. Muitos estudos apontam para o uso de métodos de biologia molecular (Ramírez *et al.*, 2009; Gilber *et al.*, 2013; Llano *et al.*, 2014), porém são mais caros.

Em trabalhos ainda não publicados pelo nosso grupo de pesquisa, observou-se também que tanto na infecção natural (humano diagnosticado com cardiomiopatia chagásica crônica) quanto na infecção experimental (camundongos infectados com *T. cruzi* em fase crônica), o anticorpo policlonal anti-rP21 foi capaz de reconhecer a forma nativa da proteína P21. Indicando que há grandes quantidades de proteína P21 produzida por ninhos de amastigotas durante a infecção.

A obtenção de anticorpos anti-rP21 pode ser uma alternativa para amenizar os problemas enfrentados no diagnóstico para a Doença de Chagas. Entretanto também é necessário avaliar a capacidade dessa proteína de se distribuir pela corrente sanguínea e se localizar em órgãos de importância na doença para avaliarmos se a mesma serviria como potencial carreador ou molécula antigênica para o sistema imune do hospedeiro. Neste sentido, nós também avaliamos a biodistribuição proteica da rP21.

A proteína recombinante rP21 foi inoculada pela via oral e subcutânea em 8 grupos, formados por 6 camundongos hígidos, não imunes, e os diferentes órgãos (coração, rim, baço, esôfago, fígado, intestino grosso e estômago) estavam saudáveis, com um tratamento por um curto período de tempo (3 dias), e em dose única utilizando um grupo controle (PBS), grupo com administração de 1µg, 50µg ou 200µg da proteína rP21 e a maioria dos resultados positivos só foi visualizada nessas duas últimas doses. As utilizações dessas doses são consideradas altas quando comparamos a concentração utilizada em mg/kg de animal. A administração de 50µg e

200µg por animal estão relacionadas a dose de aproximadamente 2,27mg/kg e 9,09mg/kg respectivamente (considerando o peso médio dos animais de 22 gramas).

A coleta do sangue, urina e fezes foi com o objetivo de observar se a proteína rP21 se distribuía pela corrente sanguínea e se poderia ser excretada pelos rins e intestino. Independente da via de administração empregada, a maioria dos fármacos distribuem-se para os líquidos extra e intracelular e, ao chegar ao sangue, ocorre a distribuição do fármaco para os tecidos e órgãos, caracterizando a passagem do composto da corrente sanguínea para os alvos (Fufã *et al.*, 2015).

A proteína rP21 administrada não foi detectável nas fezes e nas urinas dos animais tratados, após o período de 72 horas, entretanto estava presente nas amostras de soros dos camundongos tratados pela via subcutânea com as maiores concentrações testadas (50 e 200µg), indicando sua distribuição pela via sanguínea dos animais (**Figura 4**). Entretanto a detecção da proteína ocorreu de forma bem discreta, com o índice ELISA pouco maior que 1. Isso sugere que apesar de se distribuir pela corrente sanguínea a mesma pode ter sido degradada, estar ligada a proteínas plasmáticas ou se ligar a receptores específicos nos órgãos.

A biodisponibilidade da proteína no soro sofre influência de sua estabilidade proteica, do pH da solução e da afinidade da proteína as proteínas plasmáticas, principalmente albumina (Romero e Morilla, 2010). A rP21 apresenta pH neutro e alta estabilidade proteica (Dos Santos *et al.*, 2014), além de alta afinidade aos receptores celulares CXCR4 (Rodrigues *et al.*, 2012).

A análise da biodistribuição de um composto frequentemente é observada no início de um estudo sobre a farmacocinética de um produto. Anupama e colaboradores (2017), analisaram a ação lectina de *Sclerotium rolfsii*, (SRL) pela via intraperitoneal, sobre o crescimento tumoral de cólon humano, enxertado em camundongos BALB/c, e investigaram a farmacocinética e a biodistribuição da lectina. Além de verificarem redução de 35,8% no tamanho dos tumores tratados e na redução da angiogênese, a análise de farmacocinética e biodistribuição revelou que a lectina foi detectada no soro após 1 h e seu nível atingiu o maior pico após 24 h. A SRL nos tecidos foi detectada somente nos rins, e em pequenas quantidades também após 24h de injeção (Anupama *et al.*, 2017).

Fufã e colaboradores (2015), analisaram a biocompatibilidade e os efeitos tóxicos dos nanotubos de carbono *in vivo* utilizando camundongos BALB/c, injetando 100µl de solução salina contendo 1mg/ml de nanotubos com eutanásia dos animais após 10 dias. Observaram que o fígado, rins, pulmão e o baço apresentaram a deposição dos nanotubos, sem alterações morfológicas teciduais. Essa deposição tecidual ocorre devido ao processo de distribuição do fármaco que depende, como já falamos da sua afinidade com proteínas plasmáticas e receptores celulares (Fufã *et al.*, 2015).

Para observar a ligação da rP21 aos órgãos dos animais tratados nos utilizamos o ensaio de imunofluorescência indireta utilizando o anticorpo policlonal de coelho anti-rP21. Observamos que somente o estômago apresentou deposição da proteína, e com comportamento diferente em cada via. Pela via oral, a proteína é visualizada nas glândulas estomacais (**Figura 5**), com a porcentagem de fluorescência cerca de 5x maior nos animais tratados com 200µg. Na administração pela via subcutânea, rP21 pode ser observada na túnica muscular do estômago (**Figura 6**), com porcentagem de fluorescência 20 vezes maior do que nos animais tratados com PBS. Estes dados indicam que este órgão tem receptores que fazem com que a proteína fique ligada nos mesmos.

Como a proteína recombinante rP21 é uma proteína baseada na forma nativa da proteína P21 de *T. cruzi* era esperado essa ligação no estômago. O parasito tem preferência pelas células do estômago, esôfago, intestino e coração, principalmente na fase crônica da doença e na qual o parasito também produz e secreta a proteína nativa P21 (dados ainda não publicados). Essa ligação pode estar ligada a quantidade de receptores específicos da rP21, inclusive o CXCR4.

O estômago é um órgão rico em receptores CXCR4 (Fujita *et al.*, 2015) e alterações nos níveis desses receptores vem sendo exaustivamente estudadas como marcadores de tumores estomacais (Lee e Jo, 2012). Como a proteína rP21 tem afinidade pelo receptor CXCR4 (Rodrigues *et al.*, 2012), além de ser relacionada com atividades antiangiogênica (Teixeira *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2017) e antitumorais (Borges, 2015), a rP21 pode ser relacionada aos estudos sobre a progressão de tumores estomacais avaliando sua ligação ao CXCR4 e sua deposição no estômago, principalmente pela via subcutânea.

Em nosso estudo também avaliamos os tecidos dos órgãos coletados através da coloração com *Picrosirius Red*, que é comumente utilizada para análises de fibras colágenas sob luz polarizada demonstrando visualmente a diferenciação entre colágeno tipo I e tipo III (Junqueira *et al.*, 1979). Diversos fatores podem influenciar na produção de colágeno pelos diferentes tecidos do organismo, entre elas a utilização de medicamentos, e o processo de cicatrização tecidual desenvolvido (Fang e Holl, 2013).

Existem muitos trabalhos descrevendo a alteração do tipo de colágeno com a tendência metastática dos tumores, seja em avaliações do estroma de glândulas salivares (Samar *et al.*, 2012) como em tumores de mama (Kakkad *et al.*, 2012). Nos tumores invasivos e que realizavam metástase a densidade de fibras de colágeno tipo I é superior do que as encontradas nos tumores não metastáticos. Esses dados indicam que as fibras de colágeno tipo I podem ser consideradas um indicador de tumores metastáticos.

O coração normalmente apresenta pequenas porções teciduais com fibras colágenas e elásticas (Messas *et al.*, 2013), o que pode ser confirmada pelo presente trabalho. As fibras colágenas avaliadas estão localizadas em maior quantidade revestindo a parede dos vasos sanguíneos cardíacos, assim como nos diferentes órgãos estudados, os quais as fibras colágenas tipo I e tipo III conferem rigidez e flexibilidade, respectivamente.

A alteração na quantidade de colágeno nas fibras do coração pode ser indicativa de algumas doenças cardíacas. O coração é o principal órgão envolvido na fibrose tecidual que ocorre durante a fase crônica da Doença de Chagas (Caliari *et al.*, 2002).

Durante análises realizadas no coração após o tratamento com a proteína rP21, estimava-se que o resultado poderia ter apresentado um aumento na quantidade de fibras no órgão, pois estudos com a proteína P21 indicam que ela pode ser de grande importância na fase crônica da doença (Teixeira, *et al.*, 2015). Porém em coração saudável, foco do nosso estudo, os níveis tanto de colágeno tipo I quanto do tipo III foram semelhantes ao grupo controle, em ambas vias de inoculação da proteína, indicando que a rP21 não influenciou na diferenciação da proteína colágeno neste órgão.

A expressão de colágeno tipo I e tipo III durante as análises obteve diferentes percentuais em cada órgão. No estômago, esôfago e intestino grosso era esperada uma maior porcentagem de colágeno, devido a densidade de fibras reticulares que compõe os mesmos, visto que nestes órgãos há uma necessidade de maior flexibilidade para que possam passar por mudanças de forma ou volume (Horch *et al.*, 2005). Em nosso trabalho, esta quantidade fica em torno de 1% da área/campo, apontando a predominância de colágeno I nestes tecidos.

O esôfago não apresentou alterações na deposição de colágeno em nenhum dos tratamentos com a rP21, apontando porcentagens similares entre os grupos. Embora apresente uma boa quantidade de colágeno (uma média de 1% de área), não houve a alteração dessa proteína (**Figura 8**).

Um exemplo de que o aumento de colágeno no esôfago pode levar a lesões é a esofagite eosinofílica, uma doença inflamatória alérgica que pode causar fibroses no tecido do esôfago. A fibrose causada pela doença pode ocorrer pela transição que as células epiteliais sofrem no decorrer da evolução do quadro clínico da doença, tornando-se células mesenquimais. Estas células adquirem características de miofibroblastos ativados causando fibrose no tecido do esôfago (Muir *et al.*, 2015).

No intestino grosso a distribuição das fibras de colágeno tipo I e tipo III foi bem visualizada no tecido conjuntivo que envolve as vilosidades do intestino. Essa distribuição

ocorreu de maneira uniforme por todo o tecido, pois o mesmo se encontrava saudável e sem obstrução (**Figura 8**).

Tecidos parasitados (Aguilar-Nascimento *et al.*, 1998), podem apresentar a deposição de colágeno no local onde ocorre a fixação da ventosa do parasito ou se depositar de forma localizada, perto de obstruções no colo intestinal. No nosso estudo, não houve um aumento na porcentagem de área de colágeno tipo I e nem do tipo III, demonstrando que a proteína rP21 não altera a estrutura do órgão e não influencia na disposição do colágeno no mesmo.

Após o tratamento com rP21 pela via de inoculação subcutânea, foi observado no estômago uma diferença de porcentual de colágeno nos animais tratados com 200µg de proteína recombinante pelo tecido quando comparado aos animais do grupo tratados com PBS (**Figura 7**). Assim como no intestino grosso, a deposição de colágeno no estômago ocorre principalmente no tecido conjuntivo.

A diferença de porcentual de deposição do colágeno nesse órgão pode ser justificada pela forma como ocorre a aplicação da proteína, visto que a rP21 foi inoculada próximo a cavidade intraperitoneal. Esta cavidade abriga vários órgãos, inclusive o estômago, o que pode justificar a maior deposição de colágeno neste órgão.

Além disso, estes dados confirmam o que foi visualizado no ensaio por RIFI, no qual aponta que a rP21 se deposita no estômago, via oral, a rP21 se deposita nas glândulas do estômago, indicando que sofre o processo de digestão, e por via subcutânea, se deposita no tecido epitelial do estômago. O estômago apresentou um aumento na deposição de fibras colágenas após inoculação de rP21 principalmente pela via subcutânea (**Figura 7H**). A presença de proteína rP21 no estômago pode ocasionar alta quimiotaxia de leucócitos, atividade anti-angiogênica e capacidade de deposição de colágeno tecidual (Teixeira *et al.*, 2015).

Rodrigues e colaboradores, 2012, mostraram que esta proteína aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos através da ligação do receptor de quimiocinas CXCR4, induzindo também a polimerização do citoesqueleto de actina da célula hospedeira. Entre todos os órgãos analisados, somente o estômago teve alteração na deposição de colágeno tecidual.

Nos rins, foi observado neste estudo houve uma pequena diferença na incidência de colágeno tipo I e tipo III, onde mais uma vez a densidade de fibras colágenas tipo I foi maior que as do tipo III (**Figura 10**). Porém os resultados analisados por testes estatísticos demonstraram que os diferentes porcentuais apontados não têm diferença ao ser comparado ao grupo PBS (controle), e nenhuma das vias de tratamento e as dosagens administradas influenciaram para a maior produção de colágeno I e III por este tecido.

O fígado, sendo uma glândula do sistema digestivo desempenha uma função central no metabolismo das substâncias expostas ao organismo por estar localizado entre o trato digestivo e a circulação geral do corpo. Durante o tratamento com a proteína recombinante rP21 tanto por via oral como por via subcutânea, o fígado assim como os outros órgãos da pesquisa teve contato com a proteína rP21 em diferentes concentrações, porém não houve alteração na produção de colágeno pelo órgão, segundo análises estatísticas realizadas entre o grupo controle (PBS) e os diferentes grupos das demais dosagens administradas (**Figura 9**).

O estudo do colágeno no fígado é comumente realizado para avaliar a fibrose tecidual. Silva, 2017, avaliou a atividade fibrogênica da IL-9 tanto no fígado quanto renal e observou aumento da deposição de colágeno I e III em ambos os órgãos, bem como desencadeou resposta inflamatória com o recrutamento de linfócitos, neutrófilos e macrófagos. Os resultados sugerem um papel deletério da IL-9 no aumento da fibrose hepática e renal, com exacerbação da resposta inflamatória, indicando que a mesma poder ser alvo terapêutico para o tratamento dessas doenças.

A proteína recombinante rP21 sozinha, não exerceu influência na quantidade de proteína colágeno tipo I e tipo III no baço em nenhuma das vias de administração da proteína segundo comparações realizadas entre os diferentes grupos tratados com a proteína e o grupo controle.

O baço pode sofrer mudanças de forma e volume decorrentes da doença parasitária, como a esquistossomose e durante a fase crônica da Doença de Chagas assim como o fígado, caracterizando a hepatomegalia e esplenomegalia (Campos *et al.*, 2016). Durante a fase aguda da Doença de Chagas, o baço pode apresentar um aumento de seu peso e volume decorrente ao processo inflamatório que acaba por atingir o órgão. Esta mudança de forma pode se alterar durante a fase crônica, tendo uma diminuição, porém sem retornar à sua forma original (Pereira *et al.*, 2002).

Apesar de ser baseada na forma nativa da proteína P21, importante na fase crônica da doença, não houve alterações na produção de colágeno no baço com a inoculação de rP21.

Além da avaliação da quantidade de colágeno tipo I e tipo III nos tecidos coletados, também analisamos as alterações histopatológicas ocorridas nos animais tratados com rP21, bem como nos respectivos grupos controles. Os órgãos foram examinados com intuito de determinar se essa proteína provocaria uma resposta inflamatória nesses tecidos, consequentemente, com o recrutamento de leucócitos. Observou-se que não ocorreram lesões teciduais mas houve leve alteração no infiltrado inflamatório (Tabela 2).

A primeira defesa do organismo a um dano ou alteração tecidual é a resposta inflamatória, com aumento no número de células do sistema imune no local do dano (Gaber *et*

al., 2017). Na Doença de Chagas ocorre um aumento no infiltrado inflamatório, mesmo sendo intenso na fase aguda, é clinicamente silencioso, porém constante e persiste durante anos em pacientes na fase crônica da doença (Rassi Jr *et al.*, 2009) e desempenha um papel fundamental na patogenia da doença (Soares *et al.*, 2001).

A rP21, administrada em animais saudáveis, foi capaz de estimular alteração na população de células do sistema inflamatório. Entretanto foi de forma leve, mesmo nos tecidos que ocorrem a deposição da proteína após a inoculação. Além disso, no nosso trabalho foram administradas altas doses de proteína isolada e por isso acreditamos que a rP21 não se comporta de forma semelhante a infecção pelo *T. cruzi*, na qual a quantidade de P21 secretada é bem menor e os danos são muito maiores.

Para avaliar se a proteína não foi degradada pelas proteases do soro dos camundongos quando estava na corrente sanguínea, foi realizado um ensaio *in vitro* incubando a proteína rP21 com o soro de animal jovem e não imune por diferentes tempos em estufa a 37°C. Após os tempos pré-determinados (0h, 1h, 3h, 6h, 9h, 12h e 24h) observamos, por eletroforese, que a proteína provavelmente sofre ação na sua cauda de histidina após 1h de incubação (**Figura 11A**). Entretanto, com a análise da densitometria do gel não houve diferença estatística (**Figura 11B**). Essas análises demonstram a estabilidade da proteína frente as proteases presentes no soro de animais.

Esse ensaio corrobora os ensaios sobre a estabilidade da proteína rP21 por (Dos Santos *et al.*, 2014), nos quais a mesma foi avaliada sobre temperaturas extremas, alterações de pH e em altas concentrações de ureia. Em todas as situações a proteína sofre o processo de renovelamento e se mantém estável e ativa.

Para testar a atividade da proteína desafiada com as proteases do soro do camundongo, também realizamos o ensaio de fagocitose de partículas de zimozan (**Figura 12**). A rP21 apresenta atividade pró-fagocítica bastante relatada (Da Silva *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2012; Dos Santos *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2017), e o teste com zimozan é de baixo custo, de simples metodologia e que permite uma boa visualização das partículas que foram fagocitadas pelos macrófagos (Rashidfarrokhi *et al.*, 2017).

Nos presentes ensaios foi possível confirmar a atividade pró-fagocítica da rP21, pois foi observado que a associação de rP21 e soro praticamente dobra a quantidade de partículas de zimozan internalizadas pelos macrófagos, no tempo 0h, mantendo 500 partículas mesmo após a proteína rP21 ter sido incubada por 24 horas com as proteases do soro dos camundongos. O número maior de fagocitose das partículas de zimozan quando a proteína se associa ao soro

ocorre porque os macrófagos apresentam receptores para a cadeia constante dos anticorpos presentes no soro (FcR) e assim se tornam sensibilizados (Aderem e Underhill, 1999). Para tentar minimizar a influência da ativação do FcR, todos os macrófagos foram pré incubados com 50µl de soro por poço antes da realização do teste com a proteína rP21 + soro + zimozan. Dessa forma, os resultados se tornam semelhantes aos trabalhos já publicados (Dos Santos *et al.*, 2014).

A diminuição no tamanho da proteína rP21 observada no gel SDS-PAGE 12%, possivelmente pela quebra na cauda de histidina, não interferiu nesta propriedade da proteína. Uma proteína sofrer quebra na sua molécula não necessariamente a faz perder a função. A especificidade proteica é determinada pela estreita relação que existe entre a estrutura da proteína e suas propriedades biológicas e, provavelmente, apenas uma fração (sítio ativo) da molécula é responsável pela ligação ao seu ligante (Pohl, 2002).

Apesar de diferentes estudos apontarem as propriedades conhecidas até o momento da proteína recombinante rP21, seu potencial ainda não foi totalmente esclarecido, incluindo o estudo farmacocinético da proteína. Vários trabalhos vêm demonstrando a importância da proteína P21 no desenvolvimento da Doença de Chagas, relacionando a mesma com a internalização do parasito (Da Silva *et al.*, 2009), com a permanência do protozoário no ambiente intracelular, através da sua atividade pró fagocítica e a manutenção de baixo parasitismo nas células infectadas (Rodrigues *et al.*, 2012). A proteína P21 também vem sendo relacionada com a alta quimiotaxia de leucócitos e atividade antiantigênica (Teixeira *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2017).

A rP21 é secretada constantemente pelo protozoário e suas propriedades demonstraram ser importantes não apenas para o parasitismo do *T. cruzi*, mas também pode contribuir de diversas maneiras para outros indivíduos, quando isolada.

Dessa forma, nossos estudos farmacocinéticos relacionados à distribuição tecidual, eliminação e estabilidade proteica são essenciais para a iniciar os ensaios para potenciais empregos da proteína rP21. Nosso trabalho vem demonstrar que a proteína rP21 pode ser explorada para a melhoria do diagnóstico ou do tratamento da Doença de Chagas, pois não apresenta toxicidade para os tecidos saudáveis, podendo ser administrada em animais para realizar estudo sobre a fase crônica da Doença de Chagas. Além disso, ela se mantém estável mesmo na presença de proteases do soro, permanece na corrente sanguínea por um período, e é capaz de se ligar a órgãos importantes no desenvolvimento da doença.

O aumento na porcentagem de colágeno no estômago pode ser explorado no sentido de sua ação anti-tumoral. Estudos demonstram que ocorre um o aumento da expressão de

receptores CXCR4 em tumores estomacais (Fujita *et al.*, 2015), além de aumento da formação de vasos nos tecidos tumorais (Forster *et al.*, 2017) e esse receptor tem se tornado um alvo para estudos sobre câncer gástrico por apresentar atividade anti-angiogênica resultando no impedimento da progressão de tumores (Ingold *et al.*, 2010). A proteína rP21 tem ação anti-tumoral em tumores Erlich (Borges, 2015) e na atividade anti-angiogênica (Teixeira *et al.*, 2017), e demonstramos, neste trabalho, que ocorre aumento na deposição de colágeno no estômago com a administração da rP21, provavelmente pela ligação dos receptores CXCR4 a proteína. Assim poderia ser alvo de estudos se esta ligação poderia acarretar em uma ação anti-tumoral em tumores gástricos, elucidando novas propriedades da rP21.

O emprego da rP21 pode abordar muitas outras atividades já demonstradas em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Com nossos resultados, o isolamento e aplicação da proteína rP21 poderia permitir sua utilização em métodos diagnósticos com metodologias mais baratas e com técnicas convencionais. Estudos sobre o perfil de leucócitos e citocinas recrutados após a inoculação da proteína elucidariam melhor os resultados no presente trabalho, bem como sua atividade em animais infectados para seu futuro emprego no tratamento da doença. Além disso, elucidar a resposta imune formada após a administração proteica permitiria seu emprego em vacinas e/ou como carreador de outras substâncias. Enfim, explorar a proteína rP21 permitiria melhorias nas condições de pacientes chagásicos, que enfrentam, ainda hoje, muitas dificuldades.

6 Conclusões

Os estudos farmacocinéticos são essenciais para a validação de potenciais empregos de proteína em novos testes de diagnóstico ou tratamento. Nosso trabalho avaliou a distribuição tecidual, a eliminação e a estabilidade da proteína rP21 após administração pela via oral e subcutânea em modelo murino. Foi demonstrado que a proteína rP21 pode continuar a ser explorada pois não apresenta toxicidade para os tecidos saudáveis. Além disso, ela se mantém estável mesmo na presença de proteases do soro, permanece na corrente sanguínea por um período, e é capaz de se ligar a órgãos que são importantes no desenvolvimento da doença.

Assim, poderia ser melhor estudada sobre sua atividade na fase crônica da Doença de Chagas. O isolamento e a aplicação da rP21, além da obtenção de anticorpos anti-rP21, poderia permitir sua utilização em métodos de diagnóstico e novos tratamentos para a Doença de Chagas, utilizando metodologias baratas e convencionais.

7 Referências Bibliográficas

ABRAS, A. et al. Serological Diagnosis of Chronic Chagas Disease: Is It Time for a Change? **J Clin Microbiol**, v. 54, n. 6, p. 1566-72, Jun 2016. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27053668> >.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 593-623, 1999. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10358769> >.

AGUILAR-NASCIMENTO, J. E. et al. Collagen variation during experimental acute obstruction of the left colon. **Dig Surg**, v. 15, n. 3, p. 252-5, 1998. ISSN 0253-4886. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9845594> >.

ALVES, M. J.; COLLI, W. Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. **Subcell Biochem**, v. 47, p. 58-69, 2008. ISSN 0306-0225. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18512341> >.

AMATO NETO, V. et al. False-positive results of a rapid K39-based strip test and Chagas disease. **Int J Infect Dis**, v. 13, n. 2, p. 182-5, Mar 2009. ISSN 1878-3511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18786847> >.

ANUPAMA, S. et al. Pharmacokinetics, biodistribution and antitumour effects of Sclerotium rolfssii lectin in mice. **Oncol Rep**, v. 37, n. 5, p. 2803-2810, May 2017. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28394001> >.

BARRIAS, E. S.; DE CARVALHO, T. M.; DE SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. **Front Immunol**, v. 4, p. 186, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23914186> >.

BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Trop**, v. 156, p. 1-16, Apr 2016. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26747009> >.

BHATTACHARYYA, T. et al. Analysis of molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* trypomastigote small surface antigen reveals novel epitopes, evidence of positive selection and potential implications for lineage-specific serology. **Int J Parasitol**, v. 40, n. 8, p. 921-8, Jul 2010. ISSN 1879-0135. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20097201> >.

BORGES, B. C. et al. Mechanisms of Infectivity and Evasion Derived from Microvesicles Cargo Produced by *Trypanosoma cruzi*. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 6, p. 161, 2016. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27921011> >.

BORGES, B. C. Caracterização das atividades biológicas da proteína recombinante P21de *Trypanosoma cruzi* sobre linhagem celular tumoral de mama *in vitro*. **Dissertação (mestrado)**. Programa de Pós-graduação em biologia celular e estrutural aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. MG. 2015.

BRASIL, P. E.; CASTRO, R.; CASTRO, L. Commercial enzyme-linked immunosorbent assay versus polymerase chain reaction for the diagnosis of chronic Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 1, p. 1-19, Jan 2016. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26814640> >.

BURGOS, J. M. et al. Differential distribution of genes encoding the virulence factor trans-sialidase along *Trypanosoma cruzi* Discrete typing units. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58967, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23536842> >.

CABALLERO, Z. C. et al. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 8, p. 1045-9, Aug 2007. ISSN 1556-6811. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522327> >.

CALIARI, M. V. et al. Quantitative analysis of cardiac lesions in chronic canine chagasic cardiomyopathy. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 44, n. 5, p. 273-8, 2002 Sep-Oct 2002. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12436168> >.

CAMPOS, C. F. et al. Enteric Neuronal Damage, Intramuscular Denervation and Smooth Muscle Phenotype Changes as Mechanisms of Chagasic Megacolon: Evidence from a Long-Term Murine Model of *Trypanosoma cruzi* Infection. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153038, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27045678> >.

CARREA, A.; DIAMBRA, L. Systems Biology Approach to Model the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0146947, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26752404> >.

Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 90, n. 6, p. 33-43, Feb 2015. ISSN 0049-8114. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25671846> >.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 31-40, Jul 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753455> >.

DA SILVA, C. V. et al. Characterization of a 21kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes Infect**, v. 11, n. 5, p. 563-70, Apr 2009. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19344784> >.

DIAS, J. C. et al. 2 nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 3-60, Dec 2016. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27982292> >.

DOS SANTOS, M. A. et al. A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. **Sci Rep**, v. 4, p. 4259, 2014. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24590372> >.

DOS SANTOS, M. A. Estudos das vias de sinalização mobilizadas pela cepa G de *Trypanosoma cruzi* na invasão celular, da sinalização intracelular ativada pela proteína P21-HIS6 e seu renovelamento. **Dissertação (Mestrado)**. Programa de Pós-Graduação em Biologia

Celular e Estrutural Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 98f. 2013.

DVORAK, J. A.; HYDE, T. P. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. **Exp Parasitol**, v. 34, n. 2, p. 268-83, Oct 1973. ISSN 0014-4894. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4583055> >.

EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol**, v. 126, n. 3, p. 283-91, Nov 2010. ISSN 1090-2449. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599990> >.

FANG, M.; HOLL, M. M. Variation in type I collagen fibril nanomorphology: the significance and origin. **Bonekey Rep**, v. 2, p. 394, Aug 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24422113> >.

FERNANDES, A. B. et al. Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. **Parasitol Res**, v. 100, n. 1, p. 59-68, Dec 2006. ISSN 0932-0113. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16791632> >.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 3, p. 734-47, May 2012. ISSN 1574-6976. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22339763> >.

FERNANDES, M. C. et al. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. **J Exp Med**, v. 208, n. 5, p. 909-21, May 2011. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21536739> >.

_____. Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. **Cell Microbiol**, v. 15, n. 6, p. 977-91, Jun 2013. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23241026> >.

FIELD, M. C. et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nat Rev Microbiol**, v. 15, n. 4, p. 217-231, Feb 2017. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28239154> >.

FORSTER, J. C. et al. A review of the development of tumor vasculature and its effects on the tumor microenvironment. **Hypoxia (Auckl)**, v. 5, p. 21-32, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28443291> >.

FREIRE-DE-LIMA, L. et al. The trans-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: Three decades of studies. **Glycobiology**, v. 25, n. 11, p. 1142-9, Nov 2015. ISSN 1460-2423. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26224786> >.

FUFĂ, M. O. et al. In vivo biodistribution of CNTs using a BALB/c mouse experimental model. **Rom J Morphol Embryol**, v. 56, n. 4, p. 1481-93, 2015. ISSN 1220-0522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26743298> >.

FUJITA, T. et al. Identification and Characterization of CXCR4-Positive Gastric Cancer Stem Cells. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0130808, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26110809> >.

FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Imaging angiogenesis and the microenvironment. **APMIS**, v. 116, n. 7-8, p. 695-715, 2008 Jul-Aug 2008. ISSN 0903-4641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18834413> >.

GABER, T.; STREHL, C.; BUTTGEREIT, F. Metabolic regulation of inflammation. **Nat Rev Rheumatol**, v. 13, n. 5, p. 267-279, May 2017. ISSN 1759-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28331208> >.

GEBREKRISTOS, H. T.; BUEKENS, P. Mother-to-Child Transmission of *Trypanosoma cruzi*. **J Pediatric Infect Dis Soc**, v. 3 Suppl 1, p. S36-40, Sep 2014. ISSN 2048-7207. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25232476> >.

GILBER, S. R. et al. Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 3, p. 310-5, 2013 May-Jun 2013. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23856879> >.

GONÇALVES, A. L. et al. A new faecal antigen detection system for *Strongyloides venezuelensis* diagnosis in immunosuppressed rats. **Exp Parasitol**, v. 125, n. 4, p. 338-41, Aug 2010. ISSN 1090-2449. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20206167> >.

_____. Antigen, antibody and immune complex detection in serum samples from rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Exp Parasitol**, v. 130, n. 3, p. 205-8, Mar 2012. ISSN 1090-2449. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22306281> >.

HORCH, R. E. et al. Tissue engineering of cultured skin substitutes. **J Cell Mol Med**, v. 9, n. 3, p. 592-608, 2005 Jul-Sep 2005. ISSN 1582-1838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16202208> >.

HYDE, T. P.; DVORAK, J. A. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. 2. Quantitative analysis of the penetration phase. **Exp Parasitol**, v. 34, n. 2, p. 284-94, Oct 1973. ISSN 0014-4894. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4583056> >.

INGOLD, B. et al. Vascular CXCR4 expression - a novel antiangiogenic target in gastric cancer? **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10087, Apr 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20386750> >.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**, v. 11, n. 4, p. 447-55, Jul 1979. ISSN 0018-2214. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/91593> >.

KAHN, S. et al. *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. **J Exp Med**, v. 182, n. 5, p. 1243-58, Nov 1995. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7595195> >.

KAKKAD, S. M. et al. Collagen I fiber density increases in lymph node positive breast cancers: pilot study. **J Biomed Opt**, v. 17, n. 11, p. 116017, Nov 2012. ISSN 1560-2281. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23117811> >.

KINOSHITA-YANAGA, A. T. et al. Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: case report. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 51, n. 5, p. 295-8, 2009 Sep-Oct 2009. ISSN 1678-9946. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19893984> >.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> >.

LEE, H. J.; JO, D. Y. The role of the CXCR4/CXCL12 axis and its clinical implications in gastric cancer. **Histol Histopathol**, v. 27, n. 9, p. 1155-61, 09 2012. ISSN 1699-5848. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22806902> >.

LEIBY, D. A. et al. Frequency of *Trypanosoma cruzi* parasitemia among infected blood donors with a potential association between parasite lineage and transfusion transmission. **Transfusion**, Mar 2017. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28295355> >.

LESCURE, F. X. et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. **Lancet Infect Dis**, v. 10, n. 8, p. 556-70, Aug 2010. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20670903> >.

LLANO, M. et al. [Preliminary evaluation of the commercial kit Chagas (*Trypanosoma cruzi*) IgG-ELISA ® in Colombian individuals]. **Biomedica**, v. 34, n. 2, p. 228-36, 2014 Apr-Jun 2014. ISSN 0120-4157. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967928> >.

LONGHI, S. A. et al. Evaluation of in-house ELISA using *Trypanosoma cruzi* lysate and recombinant antigens for diagnosis of Chagas disease and discrimination of its clinical forms. **Am J Trop Med Hyg**, v. 87, n. 2, p. 267-71, Aug 2012. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22855757> >.

MACHADO, F. C. et al. Recruitment of galectin-3 during cell invasion and intracellular trafficking of *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes. **Glycobiology**, v. 24, n. 2, p. 179-84, Feb 2014. ISSN 1460-2423. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24225883> >.

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.

MAEDA, F. Y.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. **Front Immunol**, v. 3, p. 361, 2012. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23230440> >.

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. 68f. 2015.

MESSAS, E.; PERNOT, M.; COUADE, M. Arterial wall elasticity: state of the art and future prospects. **Diagn Interv Imaging**, v. 94, n. 5, p. 561-9, May 2013. ISSN 2211-5684. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23619291> >.

MORTARA, R. A. et al. Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. **Subcell Biochem**, v. 47, p. 101-9, 2008. ISSN 0306-0225. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18512345> >.

MUIR, A. B. et al. Esophageal epithelial cells acquire functional characteristics of activated myofibroblasts after undergoing an epithelial to mesenchymal transition. **Exp Cell Res**, v. 330, n. 1, p. 102-10, Jan 2015. ISSN 1090-2422. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25183431> >.

NUNES, M. C. et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n. 9, p. 767-76, Aug 2013. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23770163> >.

OLIVERA, M. J. et al. Safety Profile of Nifurtimox and Treatment Interruption for Chronic Chagas Disease in Colombian Adults. **Am J Trop Med Hyg**, v. 93, n. 6, p. 1224-30, Dec 2015. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26392162> >.

PATINO, L. H.; RAMÍREZ, J. D. RNA-seq in kinetoplastids: A powerful tool for the understanding of the biology and host-pathogen interactions. **Infect Genet Evol**, v. 49, p. 273-282, Apr 2017. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28179142> >.

PAUCAR, R.; MORENO-VIGURI, E.; PÉREZ-SILANES, S. Challenges in Chagas Disease Drug Discovery: A Review. **Curr Med Chem**, v. 23, n. 28, p. 3154-3170, 2016. ISSN 1875-533X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27356544> >.

PEREIRA JÚNIOR, C. E. B.; MARKMAN FILHO, B. Clinical and echocardiographic predictors of mortality in chagasic cardiomyopathy--systematic review. **Arq Bras Cardiol**, v. 102, n. 6, p. 602-10, Jun 2014. ISSN 1678-4170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25004422> >.

PEREIRA, K. S. et al. Transmission of chagas disease (American trypanosomiasis) by food. **Adv Food Nutr Res**, v. 59, p. 63-85, 2010. ISSN 1043-4526. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20610174> >.

PEREIRA, S. A. et al. Morphometric study of the spleen in chronic Chagas' disease. **Am J Trop Med Hyg**, v. 66, n. 4, p. 401-3, Apr 2002. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12164295> >.

PINTO, A. Y. et al. Clinical follow-up of responses to treatment with benznidazol in Amazon: a cohort study of acute Chagas disease. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64450, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23724050> >.

POHL, N. L. Nonnatural substrates for polyketide synthases and their associated modifying enzymes. **Curr Opin Chem Biol**, v. 6, n. 6, p. 773-8, Dec 2002. ISSN 1367-5931. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12470730> >.

QUINTAL, A. P. et al. Revealing the kinetics of *Leishmania chagasi* infection in the male genital system of hamsters. **Infect Dis Poverty**, v. 5, p. 29, 2016. ISSN 2049-9957. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27025459> >.

RAMÍREZ, J. D. et al. Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 12, p. 3945-51, Dec 2009. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19846646> >.

RASHIDFARROKHI, A.; RICHINA, V.; TAFESSE, F. G. Visualizing the Early Stages of Phagocytosis. **J Vis Exp**, n. 120, Feb 2017. ISSN 1940-087X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28191879> >.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 2010. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399979> >.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 152-8, Jul 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753470> >.

REIGNAULT, L. C. et al. Structures containing galectin-3 are recruited to the parasitophorous vacuole containing *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages. **Parasitol Res**, v. 113, n. 6, p. 2323-33, Jun 2014. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24760627> >.

RODRIGUES, A. A. et al. IFN- γ plays a unique role in protection against low virulent *Trypanosoma cruzi* strain. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 4, p. e1598, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22509418> >.

ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 62, n. 4-5, p. 576-88, Mar 2010. ISSN 1872-8294. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19941920> >.

SAMAR, MARIA ELENA.; ÁVILA, RODOLFO ESTEBAN.; ASIS, ONELL GABRIELA.; FONSECA, ISMAEL.; CORBALL, ALBERTO. Identificación de Colágeno I y III con Picrosirius Red/ Polarización en el Estroma de Tumores Salivales. **International Journal of Odontostomatology**. Volume 6 (1): 59-64, 2012. ISSN 0718-381X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2012000100008>>

SANTOS, F. L. et al. Chronic Chagas Disease Diagnosis: A Comparative Performance of Commercial Enzyme Immunoassay Tests. **Am J Trop Med Hyg**, v. 94, n. 5, p. 1034-9, May 2016. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26976886> >.

SILVA, N. S. L. Impacto deletério da interleucina-9 na fisiologia hepatorenal. **Dissertação (Mestrado)**. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 84f. 2017.

SOARES, M. B.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **An Acad Bras Cienc**, v. 73, n. 4, p. 547-59, Dec 2001. ISSN 0001-3765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11743602> >.

TARDIEUX, I.; NATHANSON, M. H.; ANDREWS, N. W. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients. **J Exp Med**, v. 179, n. 3, p. 1017-22, Mar 1994. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8113670> >.

TARDIEUX, I. et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 71, n. 7, p. 1117-30, Dec 1992. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1473148> >.

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. **Sci Rep**, v. 7, p. 44978, Mar 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28322302> >.

TEIXEIRA, S. C. atividade antiangiogênica da forma recombinante da proteína 21 de *Trypanosoma cruzi*. **Dissertação (Mestrado)**. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 67f. 2016.

TEIXEIRA, T. L. et al. *Trypanosoma cruzi* P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy. **Sci Rep**, v. 5, p. 16877, 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26574156> >.

UMEZAWA, E. S. et al. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 5, p. 1554-60, May 1999. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10203520> >.

_____. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 449-52, Jan 2004. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14715803> >.

VIOL, M. A. et al. Detection of cross infections by *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. in dogs using indirect immunoenzyme assay, indirect fluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **Parasitol Res**, v. 111, n. 4, p. 1607-13, Oct 2012. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847278> >.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **An Acad Bras Cienc**, v. 78, n. 1, p. 87-111, Mar 2006. ISSN 0001-3765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16532210> >.

ZANFORLIN, T. et al. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* SAP proteins with host-cell lysosome exocytosis-inducing activity required for parasite invasion. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e83864, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24391838>>.

8 Anexo 1



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 082/16 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 006/16

Projeto Pesquisa: "Papel da citocina il-9 no processo de fibrose hepática".

Pesquisador Responsável: Claudio Vieira da Silva.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 06 de maio de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU