



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

Estudo da suscetibilidade de amastigotas extracelulares das
cepas G e CL de *Trypanosoma cruzi* a componentes do sistema
imune inato e adaptativo. Avaliação da atividade pró-fagocítica da
P21-His₆

Adele Aud Rodrigues

Uberlândia-MG
Janeiro-2011



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

Estudo da suscetibilidade de amastigotas extracelulares das
cepas G e CL de *Trypanosoma cruzi* a componentes do sistema
imune inato e adaptativo. Avaliação da atividade pró-fagocítica da
P21-His₆

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas como parte de
obtenção do título de Mestre

Adele Aud Rodrigues

Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva (Orientador)

Prof^a. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro (Co-orientadora)

Uberlândia-MG
Janeiro-2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- R696e Rodrigues, Adele Aud, 1986-
 Estudo a suscetibilidade de amastigotas extracelulares das
 cepas G e CL de Trypanosoma cruzi a componentes do sistema
 imune inato e adaptativo [manuscrito] : avaliação da atividade
 pró-fagocítica da P21-His₆ / Adele Aud Rodrigues. - 2011.
 109 f. : il.
- Orientador: Cláudio Vieira da Silva.
 Coorientadora: Eloísa Amália Vieira Ferro.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Apli-
 cadas.
 Inclui bibliografia.
 1. Chagas, Doença de - Teses. 2. Tripanossoma cruzi - Teses.
 3. Resposta imune - Teses. I. Silva, Cláudio Vieira da. II. Ferro,
 Eloísa Amália Vieira. III. Universidade Federal de Uberlândia.
 Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Apli-
 cadas. III. Título.

CDU: 616.98:615.478



Adele Aud Rodrigues

"Estudo da suscetibilidade de amastigotas extracelulares das cepas G e CL de *Trypanosoma cruzi* a componentes do sistema imune inato e adaptativo. Avaliação da atividade pró-fagocítica da P21-His6"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 31 de janeiro de 2011.

Prof. Dra. Thaís Cristina Baeta S. Souto Padrón – UFRJ

Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo – ICBIM/UFU

Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva (orientador) – ICBIM/UFU

Dedico este trabalho em especial:

*A meus queridos pais, Angela Maria e José Joaquim,
Que são os meus maiores mestres,
Que sempre me ensinaram os mais importantes valores da vida
E sem os quais eu não chegaria até aqui*

*A minha irmã Laura,
Por sempre proporcionar momentos de extrema felicidade
Por ser mais que uma irmã, uma companheira*

*A meu namorado Erick,
Por sempre me compreender e me apoiar em tudo,
Por sempre ter paciência,
Por sempre ter palavras de amor e compreensão*

*A Deus Pai, por me guiar e iluminar meu caminho
Por nunca deixar-me só
Por me fazer enxergar algum sentido na vida...*

Meus Sinceros Agradecimentos

*Ao meu orientador, prof. Dr. Claudio Vieira da Silva,
Por ser sempre tão prestativo e auxiliar sempre que possível,
Por todos os ensinamentos e todo o crescimento profissional proporcionado
Pela paciência em todos os momentos
Por compartilhar comigo seus saberes, suas tão originais idéias
Por acreditar em meu potencial e confiar em minhas mãos este trabalho
Por ser mais que um orientador, um amigo*

*Novamente à toda minha família,
Meus pais Angela Maria e José Joaquim,
Minha irmã Laura,
Meus irmãos de coração Giovanni e Fabiana
E ainda meu namorado Erick,
Por toda a compreensão e amor que me fornecem*

A todos os amigos do laboratório, Lillian, Flávia, Rafael, Tatiana, Aline, Ana Flávia, Mariana, Patrícia, Thaise, Alexandre, Cecílio, Fernanda, Paulo César, Thiago, Débora. Obrigada por todo auxílio prestado, por todo o carinho gerado, por toda amizade existente. Todos vocês são partes deste trabalho e de mais esta nova etapa de minha vida. Saibam que são extremamente importantes para mim

À professora Eloisa Amália Vieira Ferro, pela co-orientação, por sempre estar pronta a auxiliar e a compartilhar seus imensuráveis conhecimentos. A tenho como um exemplo profissional e pessoal a ser seguido.

Ao professor Dr. João Santana da Silva, por permitir que eu realizasse parte dos meus experimentos em seu laboratório, por ceder gentilmente os animais nocautes que foram imprescindíveis para a finalização de meu trabalho, por todo o auxílio e compreensão durante minha estadia em seu laboratório

A todo o pessoal do laboratório do Dr. João Santana, principalmente à Grace Kelly da Silva, que foi quem me recebeu, me guiou e auxiliou durante todo o processo, sempre com disponibilidade e paciência; aos técnicos Cristiane Milanezi e Wander C. R. da Silva, por todo auxílio prestado, ao Júlio A. Siqueira, por auxiliar quanto a manutenção e obtenção dos animais nocautes; por todos os alunos de pós-graduação e iniciação científica do laboratório, em especial Renata, Maria Cláudia, Manuela, Thiago, por todo o auxílio e amizade que proporcionaram.

Ao meu grande amigo Jasson Sebastián Sanabria Saosa, por ter me auxiliado durante todos os experimentos realizados no laboratório do Dr. João Santana, por ter sido um grande companheiro quando mais necessitei, quando sentia-me solitária, por ter compartilhado e proporcionado momentos de extrema alegria, por ter se tornado um grande amigo!!

Ao meu tio José Alfredo Possati Aud, a minha tia Sirlei Ferraz Aud e as primas Milena Ferraz Aud e Daniela Ferraz Aud, por todo o carinho e compreensão durante minha estadia em Ribeirão Preto, por me acolherem com todo o amor, por serem meus pais e irmãos durante os quatro meses em que estive residindo em sua moradia.

Às técnicas do BIOMOL, Dona Zilda e Edilge, pela prontidão em nos auxiliar, por ajudarem a manter o laboratório um pouco menos desorganizado (rs), por serem sempre tão simpáticas, tornando nossos dias de trabalho menos laboriosos;

Aos colegas de mestrado, por compartilharem os momentos mais difíceis desta etapa e por auxiliarem sempre que possível;

A todo o pessoal dos laboratórios de Microbiologia, Virologia, Histologia, por todos os empréstimos de materiais, pela disposição em permitir- nos que usássemos seus aparelhos constantemente;

A Priscila Silva Franco, por todo o auxílio quanto a manutenção dos animais Calomys callosus; à Dr. Thaisa Carrijo de Oliveira e aos técnicos do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal por todo o auxílio na manutenção dos animais.

*Aos colegas de graduação, em especial a minhas queridas amigas
Fernanda, Cyntia, Millena, Pollyana, Ana Carolina e Tatiane, as
“GGs”, e ao Guilherme e Lucilene, por, mesmo com a distância,
estarem sempre presentes em minha vida, por auxiliarem em momentos
difíceis e compartilharem momentos de grande felicidade, por serem tão
fiéis e companheiros. Agradeço muito a todos vocês!*

*Aos amigos externos a faculdade, Gabriela, Claritcha, Monalisa e
Júnior, Mary Ellen, Roberta, Luanny, Marlene... por me fazerem
compreender o verdadeiro sentido da amizade:*

*Aos mestres membros do Programa de Pós-graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas, por todos os ensinamentos e experiências de
vida compartilhados, por nos proporcionarem relevante crescimento
profissional e pessoal:*

*À Universidade Federal de Uberlândia, por nos proporcionar este
programa de Pós-graduação, e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro:*

*Enfim, a todos que contribuíram, direta ou
indiretamente, para que este trabalho se
concretizasse.*

Muito obrigada!

LISTA DE ABREVIACÕES

RAPD	DNA polimórfico amplificado randomicamente
MLEE	<i>multilocus enzyme electrophoresis</i>
DTU	<i>discrete typing units</i>
TCT	Tripomastigota de cultura de Tecido
ATP	Adenosina Trifosfato
PI3-K	PI3-quinase
LAMP-1	Lysosomal associated membrane protein 1
kDa	Kilo Dalton
NK	Células “ <i>Natural Killer</i> ”
TCD4 ⁺	Linfócitos T CD4 ⁺
TCD8 ⁺	Linfócitos T CD8 ⁺
IL-12	Interleucina-12

IFN- γ	Interferon-gamma
RANTES	<i>“Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted”</i>
MIP-1 β	<i>“macrophage inflammatory protein 1 beta”</i>
MCP-1	<i>“monocyte chemotactic protein-1”</i>
MIP-1 α	<i>“macrophage inflammatory protein 1 alpha”</i>
IL-17	Interleucina-17
TNF- α	<i>“Tumor necrosis factor-alpha”</i>
TLR	<i>“Toll- like receptor”</i>
NO	Óxido nítrico
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
IL-18	Interleucina-18
KO	Nocaute ou <i>“Knockout”</i> / geneticamente deficiente
M	Molar

mL	Mililitro
ng	Nanograma
IgG	Imunoglobulina G
P21-His ₆	Proteína recombinante de P21 com cauda de seis histidinas
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> - Meio de cultura de células
SFB	Soro Fetal Bovino
LIT	<i>"Liver Infusion Tryptose"</i>
PBS	Solução de salina tamponada com fosfatos
MEF	Fibroblasto embrionário de Murino
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
AE	Amastigotas Extracelulares
PPD	parafenilenodiamina
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1.0 INTRODUÇÃO	13
1.1 Considerações gerais	13
1.2 Características Gerais de <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
1.3 Mecanismos de invasão celular	19
1.4 Resposta imunológica contra <i>T. cruzi</i> em modelos animais	26
2.0 JUSTIFICATIVA	30
3.0 OBJETIVO GERAL	31
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Aspectos éticos e local de estudo	32
4.2 Cultura celular	32
4.3 Parasitos	33
4.4 Animais	33
4.5 Ensaio de Multiplicação	34
4.6 Ensaio de “ <i>release</i> ”- liberação de parasitos em sobrenadante	35
4.7 Ensaio de Multiplicação em macrófagos peritoneais	36
4.8 Análise <i>in vivo</i> - Infecção de animais selvagens e geneticamente deficientes	36
4.9 Imunossupressão de camundongos infectados com amastigotas extracelulares das cepas G e CL	37
4.10 Ensaio de invasão com tratamento de P21-His ₆	37
4.11 Análise da indução de Polimerização de actina por P21-His ₆	38
4.12 Análise da ativação de PI3-quinase por P21-His ₆	39
4.13 Ensaio de fagocitose de partículas de zimozan	39
4.14 Normas de biossegurança	40
4.15 Análise estatística	40
5.0 RESULTADOS	41
5.1 Análise da diferença de infectividade de amastigotas extracelulares das cepas G e CL	41
5.1.1 Análise da diferença no perfil de infectividade de amastigotas extracelulares das cepas G e CL, comparando infecções <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	41
5.1.2 Análise <i>in vitro</i> da possível susceptibilidade da cepa G a atuação de macrófagos	47
5.1.3 Análise <i>in vivo</i> dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro na resposta a amastigotas extracelulares das cepas G e CL	50
5.1.4 Análise da possível ativação da infecção por amastigotas extracelulares da cepa G em animais imunossuprimidos	54
5.2 Análise do Possível Potencial Pró-fagocítico de P21-His ₆	56
5.2.1 Avaliação da atividade de P21-His ₆ na invasão de diferentes patógenos	56
5.2.2 Análise da indução inespecífica de fagocitose induzida por P21-His ₆	58
5.2.3 Análise da atuação de P21-His ₆ no citoesqueleto de actina celular	60
5.2.4 Análise da possível interação de P21-His ₆ com a via de sinalização de PI3-quinase	62
6.0 DISCUSSÃO	64
6.1 Análise da diferença de infectividade de amastigotas extracelulares das cepas G e CL	64
6.1.1 Análise da diferença no perfil de infectividade de amastigotas	

extracelulares das cepas G e CL, comparando a infecção <i>in vitro</i> com <i>in vivo</i>	64
6.1.2 Análise da possível susceptibilidade da cepa G a atuação de macrófagos	66
6.1.3 Análise <i>in vivo</i> dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro na infecção por amastigotas extracelulares das cepas G e CL	68
6.1.4 Análise da possível ativação da infecção por amastigotas extracelulares da cepa G em animais imunossuprimidos	74
6.2 Análise do Possível Potencial Pró-fagocítico de P21-His ₆	76
6.2.1 Análise da indução inespecífica de fagocitose induzida por P21-His ₆	76
6.2.2 Análise da atuação de P21-His ₆ no citoesqueleto de actina celular	77
6.2.3 Análise da possível interação de P21-His ₆ com a via de sinalização de PI3-quinase	79
7.0 CONCLUSÕES	82
8.0 PERSPECTIVAS FUTURAS	83
9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

RESUMO

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas. Devido à ampla diversidade genética existente em *T. cruzi*, a espécie foi dividida em seis discretas unidades de tipagem (DTU), denominadas *T. cruzi* I a VI. A cepa G pertence ao grupo *T. cruzi* I e a CL a *T. cruzi* VI. Formas amastigotas extracelulares (AE) são consideradas importantes na manutenção do ciclo no hospedeiro vertebrado. Estudos quanto à diferença de infectividade e caracterização da suscetibilidade imunológica de parasitas pertencentes aos diferentes grupos mostram-se relevantes para que terapias baseadas na resposta imunológica sejam eficientes para todos os grupos filogeneticamente distintos. A proteína P21 de *T. cruzi* foi recentemente caracterizada e sua possível atuação no processo de internalização do parasito na célula hospedeira foi observada. Dar continuidade à caracterização funcional da P21 de *T. cruzi* por meio do emprego de sua forma recombinante (P21-His₆) é de grande relevância, pois esta poderá futuramente figurar entre os potenciais alvos terapêuticos para o tratamento da doença de Chagas. O objetivo deste trabalho foi comparar a infecção *in vitro* e *in vivo* por amastigotas extracelulares das cepas G e CL, bem como avaliar o potencial pró-fagocítico da P21-His₆. Para isto, foram realizadas experimentações *in vitro* e *in vivo*. Nos experimentos *in vitro* foi observado maior infectividade e multiplicação de AE da cepa G do que de CL. Contudo, AE da cepa G mostraram-se mais suscetíveis, tanto a atuação de macrófagos inflamatórios, em experimentos *ex vivo*, quanto daqueles diferenciados e estimulados com IFN- γ *in vitro*. Dentre os animais infectados com a cepa G, somente *C. callosus* apresentou parasitemia sub-patente e os nocautes para IL-12 e IFN- γ apresentaram parasitemia patente e alta mortalidade. Todos os animais infectados com a cepa CL apresentaram parasitemia, contudo os nocautes para TNF- α , iNOS, Myd-88 e IL-12 apresentaram maior parasitemia e mortalidade em relação aos selvagens. Em experimentos onde camundongos foram imunossuprimidos foi observada elevada parasitemia para a cepa CL e para a G. Conclui-se, portanto, que AE da cepa G provavelmente não apresentam parasitemia *in vivo* devido a sua maior suscetibilidade a atuação de macrófagos ativados com IFN- γ . Para o estudo da proteína P21, realizaram-se ensaios de invasão e de fagocitose *in vitro*, no qual macrófagos peritoneais de *C. callosus* foram infectados com AE de *T. cruzi*, promastigotas de *Leishmania amazonensis*, taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, ou ainda incubados com partículas de zimozan, e foram tratados ou não com P21-His₆. Também realizou-se imunofluorescência de filamentos de actina em macrófagos tratados ou não com P21-His₆. Finalmente, realizou-se outra reação de imunofluorescência para marcação de filamentos de actina em macrófagos que se submeteram ao tratamento de P21-His₆, ao tratamento com wortmanina, ou ambos. Os resultados demonstraram que P21-His₆ aumentou a internalização de todos os parasitos e da partícula inerte. Além disso, macrófagos tratados com a proteína apresentaram aumento na polimerização de actina cortical. No entanto, o tratamento de wortmanina conjuntamente a P21-His₆ inibiu sua atuação na polimerização da actina celular. Conclui-se, portanto, que P21-His₆ é capaz de induzir processo fagocítico inespecificamente, sendo devido a atuação da proteína no citoesqueleto de actina cortical, por um processo de sinalização provavelmente dependente da ativação de PI3-quinase.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, resposta imune, IFN- γ , P21, fagocitose, citoesqueleto de actina, PI3-quinase.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of Human Chagas disease. Due to *T. cruzi* wide genetic diversity, the species has been divided in six Discrete Typing Units (DTU), named *T. cruzi* I to VI. The G strain belongs to *T. cruzi* I group and CL to *T. cruzi* VI. Extracellular amastigotes forms (EA) are considered important in maintaining the vertebrate host cycle. Studies concerning the difference of infectiveness and the characterization of immunologic susceptibility in parasites belonging to different groups are relevant so that therapies based upon immunological response may be efficient for all distinct phylogenetic groups. *T. cruzi*'s P21 protein has recently been characterized and its probable action in parasites internalization process into host cell was observed. To give continuity to the functional characterization of *T. cruzi*'s P21 employing its recombinant form (P21-His₆) is of great relevance taking into account that these could in the future take part into the potential therapeutic goals. This work intended to compare the *in vivo* and *in vitro* infection of EA from G and CL strains, as well as to assess P21-His₆ pro-phagocytic potential. So that experiments *in vitro* and *in vivo* have been made. *in vitro* assays showed a greater infectiveness and multiplication of EA from G strain than of CL. Nevertheless EA from G strain showed more susceptible as to inflammatory macrophages action in *ex vivo* experiments as to those differentiated and *in vitro* stimulated with IFN- γ . Among the G strain infected animals, only *Calomys callosus* showed sub-patent parasitemia and the IL-12 and IFN- γ knockouts showed patent parasitemia and high mortality. All the CL strain infected animals showed parasitemia, but the TNF- α , iNOS, Myd-88 and IL-12 knockouts showed greater parasitemia and mortality in comparison to the wild ones. In the assays of immunosuppressed mice, it has been observed high parasitemia for CL and G strains. We, then conclude that EA from G strain probably don't show *in vivo* parasitemia due to its greater susceptibility to IFN- γ activated macrophages. To study P21 protein it has been made *in vitro* invasion and phagocytosis assays in that *C. callosus* peritoneal macrophages were infected with *T. cruzi*'s EA, *Leishmania amazonensis* promastigotes, *Toxoplasma gondii* tachyzoites or otherwise invaded with zymozan particle, and then treated or not with P21-His₆. It has also been made immunofluorescence of actin filaments in macrophages treated or not with P21-His₆. Finally, another immunofluorescence reaction was made in order to mark actin filaments in macrophage submitted to P21-His₆, to wortmanin treatment, or both. Results showed that P21-His₆ heightened all parasites and the inactive particle internalization. Besides macrophages treated with the protein showed increase in cortical actin polymerization. Nevertheless, the treatment with wortmanin together with P21-His₆ inhibited its action in actin cellular polymerization. We conclude that P21-His₆ is capable of inducing inespecific phagocytic process probably to its action into the cortical actin cytoskeletal, by means of signalization process probably depending on PI3-kinase activation.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, immune response, IFN- γ , P21, phagocytosis, actin cytoskeleton, PI3-Kinase.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

A doença de Chagas, que leva o nome de seu descobridor, Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, foi descoberta quando este, ao estudar casos de malária em Lassance, Minas Gerais, se interessou pelo estudo de insetos que tinham o hábito de picar a face descoberta de pessoas durante a noite. Ao examinar o intestino destes insetos, Carlos Chagas encontrou flagelados no intestino posterior de alguns exemplares. Preocupado com a possibilidade de que essas formas parasitárias representassem estágios evolutivos de *Trypanosoma minasense*, que infectavam sagüis (*Callithrix* sp), Chagas enviou os "barbeiros" para Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro para que fossem alimentados em sagüis livres de infecção. Após algumas semanas ele encontrou tripanossomas no sangue periférico de um dos animais e reconheceu como sendo de uma nova espécie, que denominou inicialmente *Schyzotrypanum cruzi* e subsequenteemente *Trypanosoma cruzi* (BRENER, 1989). Em 1909 descreveu a infecção do homem, a morfologia do parasito no sangue periférico, o seu ciclo no tubo digestivo do vetor, a cultura em agar-sangue e a transmissão ao vertebrado por flagelados do tubo digestivo de triatomíneos infectados (CHAGAS, 1909). Carlos Chagas descreveu ainda formas clínicas e reservatórios da doença. A tríplice descoberta de Carlos Chagas – transmissor, agente etiológico e doença, fazem de sua descoberta um fato único na história da medicina (BRENER, 1989). Apesar da descoberta relativamente recente, a doença ocorre há muito tempo. A presença de DNA do parasita foi detectada em tecidos mumificados de cerca de 9000 anos, em múmias do Peru e Chile (AUFDERHEIDE et al., 2004). A Organização Pan Americana de Saúde estimou que atualmente 7,7 milhões de pessoas encontram-se infectadas nos 21 países endêmicos, partindo do México até a

Argentina (SÁNCHEZ-SANCHO; CAMPILLO; PÁEZ, 2010; NUSSBAUM et al., 2010). Na 15ª reunião da Comissão Intergovernamental da Iniciativa do Cone Sul contra a doença de Chagas foi declarado formalmente a interrupção da transmissão desta doença pelo inseto vetor *Triatoma infestans* no Brasil. É importante salientar que *T. cruzi* infecta várias espécies de triatomíneos e possui vários reservatórios animais. A eliminação de uma das espécies pode levar a ocupação por outras espécies de nichos ecológicos vagos (DE SOUZA, 2007). Pode ser citado como exemplo o encontro de *Panstrongylus megistus* infectados em residências situadas na vizinhança do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (LISBOA et al., 2004).

1.2 Características Gerais de *Trypanosoma cruzi*

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

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

depositando suas fezes e urina com parasitas sobre a pele ou mucosas do hospedeiro. A penetração destes no organismo pode se dar diretamente nas mucosas ou quando o indivíduo coça o local da picada, que constitui-se de uma lesão tecidual. A partir daí, os tripomastigotas metacíclicos podem invadir uma variedade de tipos celulares, onde se diferenciam em amastigotas, que começam a se multiplicar após um período de 20 a 30 horas. No final da fase de multiplicação, quando a célula está abarrotada de parasitas, os amastigotas diferenciam-se novamente em tripomastigotas, que escapam das células hospedeiras para os espaços intercelulares ou ganham a circulação. Estes tripomastigotas, chamados tripomastigotas sanguíneos, podem então invadir novos macrófagos ou células de outros tecidos e órgãos do hospedeiro, ou serem ingeridos pelo inseto durante seu repasto sanguíneo.

A descrição do ciclo de *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado foi realizada por Gaspar Vianna (VIANNA, 1911) ao analisar a necrópsia de uma criança que havia morrido na fase aguda da doença de Chagas. Nesta época, as formas intracelulares dos parasitas (amastigotas) receberam a designação de leishmânias. Pouco tempo depois, alguns pesquisadores relataram a presença destas formas também fora de células infectadas (DELANOË, DELANOË, 1912; MAYER, ROCHA LIMA, 1914), contrariando a clássica definição da localização unicamente intracelular deste estágio evolutivo do parasita. Entretanto, os autores não deram maior importância a estes achados. Posteriormente, Rêgo (1956) mostrou a presença de amastigotas circulantes livres no sangue de camundongos infectados com a cepa Y. Ele interpretou este fato como resultado da ruptura precoce de macrófagos intensamente infectados, nos quais os parasitas não teriam completado o ciclo de diferenciação em tripomastigotas. Utilizando um anticorpo monoclonal que reconhece um antígeno de superfície específico de amastigotas (Ssp-4), Andrews et al. (1987) demonstraram que cerca de 10% das formas

circulantes de *T. cruzi* em camundongos infectados na fase aguda eram amastigotas. Eles concluíram que a diferenciação de formas tripomastigotas pode ocorrer não somente intracelularmente, mas também no sangue de hospedeiros vertebrados. Corroborando esta hipótese, foi demonstrado que tripomastigotas se transformam em amastigotas quando incubados por tempo prolongado (24-48 h) em pH neutro (ANDREWS et al., 1988; LEY et al., 1988). Além disso, também foi observado que a transformação extracelular de tripomastigotas em formas arredondadas pode ser acelerada em baixo pH (KANBARA et al., 1990) e que estes parasitas se parecem com amastigotas quando observados por microscopia de luz. Tomlinson et al. (1995) verificaram que estas formas arredondadas eram estrutural e bioquimicamente indistinguíveis de amastigotas naturais. Diante destes resultados acredita-se na existência de um ciclo alternativo envolvendo formas amastigotas no hospedeiro mamífero originárias da lise prematura das células infectadas, designadas amastigotas intracelulares (HUDSON et al., 1984; McCABE et al., 1984; UMEZAWA et al., 1985), ou por diferenciação extracelular de tripomastigotas, designados amastigotas extracelulares (PAN, 1978a; ANDREWS et al., 1987; LEY et al., 1988; MORTARA, 1991), sendo estes amastigotas intracelulares e extracelulares capazes de invadir células fagocíticas e não fagocíticas.

Diferenças na distribuição geográfica dos hospedeiros vertebrados e dos triatomíneos acompanhadas por certas preferências dos insetos vetores pela sua fonte de alimento definem dois diferentes ciclos de transmissão do *T. cruzi*: o ciclo silvestre e o doméstico/peridoméstico (WHO, 2002). No ciclo silvestre, parece haver um balanço ecológico entre o parasita, seus vetores e hospedeiros (BARRETO, 1979), enquanto que o ciclo doméstico resulta do contato entre o homem e o vetor, provocado por modificações ecológicas e sociais no ambiente (DIAS, 1987).

Além do mecanismo vetorial, a transmissão da doença de Chagas pode também ocorrer por transfusão sanguínea, transmissão congênita, infecções laboratoriais acidentais, transplante de órgãos e por via oral (DIAS, 1992). O primeiro surto de infecção humana por *T. cruzi* por via oral foi relatado em 1968, em uma escola agrícola do município de Estrela (RS), onde 17 alunos apresentaram um quadro agudo da doença de Chagas e seis morreram. A fonte exata de contaminação não foi esclarecida: suspeita-se de alimento contaminado com o parasita. Outro surto semelhante ocorreu em Catolé do Rocha (PB), atingindo 26 pessoas, das quais uma faleceu (revisado em STEINDEL et al., 2005). No período de 1968 a 2000, mais de 50% dos casos agudos de Doença de Chagas registrados na Amazônia brasileira foram atribuídos a microepidemias de infecção transmitida oralmente (COURA et al., 2002). Houve um surto de doença de Chagas cuja transmissão estava relacionada ao consumo de caldo de cana de um único ponto de venda nas margens da BR 101 (Barracão Penha II) no município de Navegantes (SC), no dia 13 de fevereiro de 2005. Foram confirmados 25 casos, sendo que três se tornaram óbitos. No local da transmissão, foram capturados reservatórios (gambá) e vetor silvestre (*T. tibiamaculata*) da doença, ambos infectados por *T. cruzi* (STEINDEL et al., 2005).

A infecção por *T. cruzi* possui apresentação clínica variável. A fase aguda inicial é caracterizada por parasitemia patente que pode perdurar por 40 a 60 dias. Os sintomas podem ser moderados e atípicos, podendo ser confundidos com os de diversas outras infecções, e conseqüentemente a infecção não é freqüentemente reconhecida neste estágio (WHO, 2002). Neste período, as formas amastigotas podem ser vistas no interior de fibras cardíacas (TORRES, 1917), células musculares lisas e esqueléticas, células endoteliais, gliais, macrófagos e fibroblastos. Depois da fase aguda, os pacientes entram na fase crônica da doença, podendo o indivíduo permanecer na forma

indeterminada por vários anos ou persistir indefinidamente. Este período é caracterizado por ausência de sintomas clínicos relevantes, baixa ou nenhuma parasitemia, mesmo que o paciente permaneça reativo em testes sorológicos de rotina. Durante este longo intervalo, pessoas infectadas vivendo em áreas endêmicas constituem em importantes reservatórios do parasita. Até 20 anos após a infecção, aproximadamente 35% dos pacientes apresentam sinais clínicos característicos da doença de Chagas, como cardiomiopatia, danos no sistema nervoso periférico ou disfunção no trato digestivo freqüentemente levando a megacólon e/ou megaesôfago (WHO, 2002).

A prevalência das formas clínicas e morbidade da doença de Chagas apresentam variações geográficas. Por exemplo, patologias digestivas associadas à infecção por *T. cruzi* predominam no Chile e no Brasil central, mas são bastante incomuns na Venezuela e na América Central (WHO, 2002). Por outro lado, a infecção por *T. cruzi* na bacia Amazônica tende a ser mais branda do que em áreas endêmicas e freqüentemente conduz à forma indeterminada da doença (ZINGALES et al., 1998; COURA et al., 2002). Estas diferenças geográficas podem estar relacionadas em parte aos aspectos genéticos e imunológicos da população humana local, mas acredita-se que elas são causadas principalmente pelas diferenças genéticas de *T. cruzi*. Quando diferentes isolados de *T. cruzi* são comparados, observa-se perfis genéticos e protéicos polimórficos. Os primeiros trabalhos que avaliaram polimorfismo em *T. cruzi*, como o padrão de zimodemas descrito por MILES et al. (1978), indicaram a existência de pelo menos três subdivisões na população do parasita, sendo uma linhagem composta principalmente por cepas híbridas. A identificação de marcadores moleculares como D7 – 24Sα rDNA e genes mini-exon permitiram uma clara distinção entre cepas de *T. cruzi* em dois grandes grupos, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (SOUTO et al., 1996; NUNES et al., 1997). Estas linhagens divergentes ocupam ambientes ecológicos distintos: o ciclo

silvestre (*T. cruzi* I) e ciclo doméstico (*T. cruzi* II) da doença de Chagas (BRIONES et al., 1999; ZINGALES et al., 1999), bem como se associam a hospedeiros silvestres distintos (YEO et al., 2005). Ao contrário de cepas de *T. cruzi* I que induzem baixo parasitismo e conduzem a um quadro assintomático em pacientes chagásicos humanos, cepas de *T. cruzi* II causam infecções com parasitemia alta (ZINGALES et al., 1999). Análises baseadas em DNA polimórfico amplificado randomicamente (RAPD), *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) e cariotipagem permitiram a divisão de *T. cruzi* II em cinco sub-grupos (BRISSE et al., 2000a; BRISSE et al., 2000b; HENRIKSSON et al., 2002), sendo que alguns destes subgrupos são híbridos, consistente com a hipótese de que recombinação genética tenha ocorrido mais de uma vez dentre as linhagens de *T. cruzi* (STURM et al., 2003). Mais recentemente, as cepas de *T. cruzi* foram divididas em seis discretas unidades de tipagem (*discrete typing units* – DTU) de acordo com seu conteúdo (*background*) genético. Estes grupos foram designados *T. cruzi* I a VI (ZINGALES et al., 2009). A distribuição geográfica destes grupos indica que *T. cruzi* II a VI são os principais agentes causadores da doença de Chagas no sudeste de partes da América do Sul, sendo *T. cruzi* I presente apenas no ciclo silvestre (ZINGALES et al 2009; Di NOIA et al., 2002; FERNANDES et al., 1999). Por outro lado, *T. cruzi* I foi descrito como agente primário da doença em humanos apenas na Colômbia, Venezuela e América Central (ANES et al., 2004; BLACK et al., 2007; MEJIA-JARAMILLO et al., 2009; ESPINOZA et al., 2010).

1.3 Mecanismos de invasão celular

O parasitismo exercido por organismos intracelulares representa um evento complexo, usualmente envolvendo um ligante codificado pelo patógeno e um receptor na célula hospedeira (BEACHEY, 1981). Neste contexto, a superfície celular

desempenha o principal papel no estabelecimento de qualquer relação parasita-hospedeiro e a identificação das moléculas envolvidas neste processo torna-se um passo obrigatório.

É importante salientar que para um patógeno ser bem sucedido em seu processo de invasão celular, ele necessita vencer inicialmente as barreiras impostas pelo hospedeiro mamífero, como o sistema complemento, anticorpos e ingestão fagocítica. Tais processos dependem basicamente da capacidade de reconhecimento da superfície do parasita como estranha (KREIER et al., 1977).

Evidências experimentais permitiram estabelecer que *T. cruzi* desenvolve mecanismos efetivos para escapar da ação lítica do sistema complemento de mamíferos. Foi observado que epimastigotas são totalmente lisados pelo complemento na ausência de anticorpo (NOGUEIRA et al., 1975), enquanto que tripomastigotas possuem moléculas de superfície que inibem a formação de C3 convertases, essenciais à ativação do sistema complemento e, portanto, resistem à lise (KIPNIS et al., 1981; JOINER et al., 1986; SCHENKMAN et al., 1986). Entretanto, tripomastigotas podem ser lisados na presença de soro imune de animais infectados (KREITLI; BRENER, 1982). Formas amastigotas extracelulares de *T. cruzi* ativam eficientemente a via alternativa do complemento, porém impedem a fixação dos componentes C5b-C9 em sua membrana, escapando da lise (IIDA et al., 1989). Por outro lado, amastigotas intracelulares são altamente susceptíveis à lise pelo sistema complemento (FERNANDES; MORTARA, 2004). Esta maior susceptibilidade pode ser atribuída ao fato de que amastigotas intracelulares estão envolvidos no crescimento intracelular em um ambiente protegido e amastigotas extracelulares precisam lidar com um meio mais hostil, onde encontram não apenas anticorpos específicos (Andrews, 1989), mas também proteínas do complemento (IIDA et al., 1989).

O processo de invasão celular pode ser dividido em adesão e interiorização (SILVERSTEIN et al., 1977). A adesão de formas tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) à célula hospedeira fixada é um processo ativo que requer energia do parasita e não requer microfilamentos da célula hospedeira intactos. Inibidores da geração de ATP inibem a adesão e penetração, sem alterarem significativamente o movimento do parasita, bem como o tratamento com citocalasina D, uma droga que rompe microfilamentos e impede a formação de extensões de membrana plasmática mediadas por actina, tem pouco ou nenhum efeito na invasão celular por TCT (SCHENKMAN et al., 1991c). Por outro lado, formas amastigotas extracelulares não aderem a células hospedeiras fixadas e a invasão ocorre de maneira dependente de microfilamentos funcionais na célula hospedeira (MORTARA, 1991; PROCÓPIO et al., 1998).

Estudos demonstraram que durante a invasão celular por TCT ocorre recrutamento e fusão de lisossomos à membrana plasmática da célula hospedeira no sítio de invasão do parasita de maneira dependente de cálcio (TARDIEUX et al., 1992; TARDIEUX et al., 1994). De acordo com este modelo, TCTs acionam um processo de sinalização que culmina com a formação do vacúolo parasitóforo (BURLEIGH; ANDREWS, 1998; BURLEIGH; WOOLSEY, 2002). Novas evidências surgem apontando para a participação de componentes anteriores da via endocítica, como dinamina e Rab5 indicando que o processo lisossomal deve ser mais elaborado e deve ocorrer após eventos primários (WILKOWSKY et al., 2002). Evidências mostram que formas tripomastigotas metacíclicas da cepa CL (*T. cruzi* VI) podem também recrutar EEA-1 (*early endosome antigen 1*) durante a invasão de células Vero infectadas com *Coxiella burnetii* (ANDREOLI; MORTARA, 2003). Por meio de uma metodologia mais quantitativa na tentativa de identificar o papel da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K) na via lisossomal, Woolsey et al. (2003) confirmaram as observações feitas

previamente por Wilkowsky et al. (2001) de que este componente celular poderia estar envolvido em uma via de internalização de TCTs independente de lisossomos. Tripomastigotas que invadem por esta via mobilizam inositóis fosforilados durante a formação do vacúolo parasitóforo inicialmente rico em marcadores de membrana e que depois se matura, tornando-se rico em marcadores lisossomais (LAMP-1) (WOOLSEY et al., 2003). Estudos demonstraram que a polimerização do citoesqueleto de actina é fundamental para a permanência dos parasitas internalizados bem como para a fusão destes a lisossomos (WOOLSEY; BURLEIGH, 2004). Neste contexto, verificou-se que a fusão do parasita com lisossomos logo após a invasão é essencial para a retenção intracelular dos parasitas (ANDRADE; ANDREWS, 2004). Durante o processo de internalização, o vacúolo parasitóforo funciona como um centro organizador de microtúbulos. Acredita-se que esta é uma etapa crítica no desenvolvimento de uma infraestrutura necessária para o transporte de lisossomos para o local da adesão parasita-célula (TYLER et al., 2005). Cerca de 2 h após a infecção, TCTs rompem o vacúolo parasitóforo pela ação de uma hemolisina ativa em pH ácido (ANDREWS, WHITLOW, 1989; ANDREWS et al., 1990) e entram no citoplasma, onde se multiplicam livremente como amastigotas (HALL, 1993).

Tripomastigotas metacíclicos invadem células HeLa penetrando em suas bordas (MORTARA, 1991), um comportamento característico de formas altamente móveis descrito por Schenkman et al. (1988). Durante a invasão de células HeLa, estas formas induzem a formação de protrusões ricas em actina ao redor do parasita (SCHENKMAN; MORTARA, 1992). Este fenômeno de protrusão de membrana não foi inibido por tratamento com citocalasina D, indicando que era devido principalmente ao parasita, sendo detectado em células HeLa mas não em MDCK (SCHENKMAN; MORTARA, 1992). Por outro lado, amastigotas extracelulares agregam filamentos de

actina por adesão às microvilosidades da superfície dorsal de células HeLa (MORTARA, 1991). Este processo é acompanhado pela formação de estruturas semelhantes a xícara embaixo do parasita culminando com a invasão celular (PROCÓPIO et al., 1999). Tratamento com citocalasina D inibe a invasão de células Vero e HeLa por formas amastigotas extracelulares, contrastando com o efeito exercido na entrada de tripomastigotas metacíclicos (PROCÓPIO et al., 1998). Estes resultados são consistentes com o fato de que cada estágio evolutivo parasitário-célula hospedeira mobilizam componentes de interação específicos.

Durante a invasão celular, formas infectivas (tripomastigotas metacíclicos, TCT e amastigotas extracelulares) de diferentes cepas mobilizam moléculas distintas para interagir com componentes da célula hospedeira. Diante da descrição na literatura de uma série de componentes envolvidos na invasão celular por tripomastigotas metacíclicos, TCT e alguns aspectos da invasão por amastigotas extracelulares, pode-se visualizar o seguinte cenário em uma infecção *in vivo*: considerando uma infecção oral, principal forma de transmissão vetorial atualmente no Brasil, tripomastigotas metacíclicos ao atingir o estômago resistem à degradação devido à proteção exercida pelas mucinas, protease-resistentes gp35/50, as quais são abundantes na superfície do parasita. A digestão por pepsina deixa intacto o domínio da gp82 que contém ambos os sítios de ligação à célula hospedeira e à mucina gástrica. Ao aderir à mucina gástrica o parasita atravessa o muco para atingir as células epiteliais subjacentes. Uma vez rompida a barreira, os tripomastigotas metacíclicos da cepa CL invadem eficientemente as células epiteliais da mucosa gástrica mobilizando a gp82 e ativando sinal de cálcio bidirecional. Os parasitas da cepa G podem atingir as células epiteliais de forma tão eficiente quanto a CL, mas a invasão pode ser impedida pela gp90. Alguns parasitas (Cepa G) mobilizam a sua internalização por meio da gp35/50. Por outro lado, parasitas

deficientes na gp82 e que expressam a gp30 como os isolados 569 e 588 teriam dificuldade em penetrar na camada grossa de mucina, porque a gp30 liga-se fracamente a mucina gástrica (NEIRA et al., 2003; CORTEZ et al., 2003; YOSHIDA, 2006).

Durante o curso da infecção, formas tripomastigotas sangüíneos contraparte das formas TCTs precisam superar as barreiras impostas pela matriz extracelular antes de atingir a célula alvo. Diante do arsenal de moléculas descritas envolvidas na invasão celular *in vitro* por estas formas, pode-se visualizar o seguinte panorama: Através de glicoproteínas de superfície pertencentes à super família da transialidase-gp85 o, parasita liga-se a fibronectina e laminina (QUIASSI et al., 1986; GIORDANO et al., 1994, 1999) abrindo caminho para a ação da POP Tc80 que hidrolisa colágeno (SANTANA et al., 1997; GRELLIER et al., 2001). Ao ligar-se a célula hospedeira através da Tc85 (ALVES et al., 1986), gp 83 (VILLALTA et al., 2001), Tc-1 (AUGUSTINE et al., 2006) ocorre posteriormente ativação da oligopeptidase B (BURLEIGH; ANDREWS, 1995a; CALER et al., 1998) do parasita que gera o fator solúvel agonista de cálcio a partir de um precursor. Ativação da mobilização de cálcio na célula hospedeira a partir deste fator secretado pelo parasita promove a invasão celular. Alternativamente ou simultaneamente, cruzipaina é secretada pelos TCTs aderidos a célula alvo, e sua atividade no cininogênio gera cininas que também induzem resposta de cálcio ao interagirem com seus receptores (SCHARFSTEIN et al., 2000; TODOROV et al., 2003). Durante este processo, a gp83 secretada pode induzir aumento na síntese de laminina γ -1 pela célula hospedeira (NDE et al., 2006), bem como a galectina-3 humana pode aumentar a adesão do parasita a laminina (MOODY; OCHIENG; VILLALTA, 2000), contribuindo para maior invasão celular. Neste ínterim, células infectadas podem romper-se liberando amastigotas, bem como tripomastigotas sangüíneos presentes na circulação podem transformar-se em amastigotas

extracelulares. Estes amastigotas são resistentes à lise pelo sistema complemento (IIDA et al., 1989) e provavelmente tem sua sobrevivência garantida após fagocitose por macrófagos devido à manutenção de um ambiente imunossupressor com atividade de TGF- β e IL-10. Estas citocinas impedem a ativação de macrófagos, permitindo que os amastigotas escapem no citosol e comecem a multiplicar (SCHARFSTEIN; MORROT, 1999). Formas amastigotas podem também infectar células não fagocíticas por um mecanismo dependente de actina e assim, por estes mecanismos, contribuir para a perpetuação da doença (PROCÓPIO et al., 1998; 1999). Formas amastigotas podem utilizar epítomos de carboidrato presentes em Ssp-4 para aderirem às proteínas com atividade lectínicas da célula hospedeira. Após a adesão, acredita-se que a P21 (SILVA et al., 2009) é secretada na justaposição parasita-célula hospedeira e ativa uma cascata de sinalização ainda desconhecida que leva a formação de ondas de actina em torno do parasita com ativação da GTPase Rac 1 (FERNANDES; MORTARA, 2004) e recrutamento de microdomínios enriquecidos em colesterol e GM1 na célula hospedeira (FERNANDES et al., 2007) bem como mobilização de cálcio dos acidocalciosomas e fosforilação de componentes de 87 e 175 kDa no parasita (FERNANDES et al., 2006), culminando com sua internalização.

A proteína P21 foi recentemente caracterizada, sendo secretada por todas as formas evolutivas do parasita e desempenha papel durante a invasão de células não fagocíticas por tripomastigotas metacíclicos e amastigotas extracelulares. A forma recombinante de P21 quando adicionada aos tripomastigotas metacíclicos e amastigotas extracelulares aumenta significativamente a invasão celular por ambas as formas (SILVA et al., 2009). Os mecanismos subjacentes a propriedade de indução da invasão celular serão alvo de nossos estudos por meio da análise de fagocitose de partículas de zimozan e diferentes protozoários intracelulares.

Os aspectos descritos acima mostram que *T. cruzi* pode explorar múltiplas interações receptor-ligante para invadir a célula hospedeira. Cada forma infectiva do parasita mobiliza uma série de componentes próprios e da célula alvo de forma a superar os obstáculos impostos pelo hospedeiro durante o processo de invasão. Considerando o fato de que o habitat natural destas formas é variado, justifica-se esta variedade de componentes mobilizados. Formas tripomastigotas metacíclicas contactam as células hospedeiras de maneira transiente ao passo que as formas TCTs residem por um período longo no hospedeiro, encontrando uma variedade de células hospedeiras e fatores relacionados com a resposta imune bem como, matriz extracelular que estes precisam transpor. As formas amastigotas assim como os TCTs encontram o mesmo ambiente hostil somado ao fato de que os amastigotas são imóveis diferentes dos tripomastigotas que contam com sua motilidade para iniciar o processo de invasão.

1.4 Resposta imunológica contra *T. cruzi* em modelos animais

Avanços no conhecimento dos mecanismos associados à patologia e resposta imunológica contra a infecção por *T. cruzi* tem se beneficiado por dados gerados a partir de modelos murinos. Estes modelos demonstraram que as respostas imune inata e adaptativa desempenham um importante papel no controle do parasita, lançando mão de ações combinadas de vários tipos celulares incluindo células matadoras naturais (NK), linfócitos T CD4+, T CD8+, macrófagos bem como de anticorpos produzidos por linfócitos B (BRENER, GAZZINELLI, 1997; DOSREIS, 1997). Resistência a infecção por *T. cruzi* se associa com a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IFN- γ e a produção local de RANTES (“*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*”), MIP-1 α (“*macrophage inflammatory protein 1 alpha*”), MIP-1 β (“*macrophage inflammatory protein 1 beta*”) e MCP-1 (“*monocyte*

chemotactic protein-1”). Estas citocinas ativam a produção de óxido nítrico por macrófagos, os quais são responsáveis pela eliminação do parasita (ALIBERTI et al., 1996; ALIBERTI et al., 1999; ANTUNEZ; CARDONI, 2000; TALVANI et al 2000; revisado por GUTIERREZ et al., 2009). TNF- α também pode ativar macrófagos como segundo sinal para a produção de óxido nítrico (ALBRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996). Pelo contrário, o perfil de citocinas IL-10, IL-4 e TGF- β estão associadas com a susceptibilidade ao parasita (RODRIGUES et al., 2000; HIYAMA et al., 2001). Recentemente foi verificado que a IL-17 constitui um importante fator para proteção contra a fase aguda da infecção por *T. cruzi* (MIYAZAKI et al., 2010).

Em 2001, o grupo de pesquisa liderado pelo Dr. Gazzinelli apresentou o primeiro exemplo de reconhecimento por receptores Toll-like (TLR) de proteínas pertencentes a grande família das mucinas de *T. cruzi*, com a produção por macrófagos de interleucina-12 (IL-12), óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral (TNF) dependente da ativação de TLR-2 (CAMPOS et al., 2001). Em seguida, foi demonstrado por outro grupo que a proteína Tc52 ativa células dendríticas via TLR-2 (OUAISSI et al., 2002). Posteriormente foi verificado que TLR-4 reconhece glicoinositolfosfolípidios livres (OLIVEIRA et al., 2004) e TLR-9 está associado ao reconhecimento de ilhas de CpG presentes no DNA do parasita (BAFICA et al., 2006).

Estudo recente descreveu alguns dos principais sinais de danos envolvendo a resposta imune no fígado durante a infecção aguda por *T. cruzi* em modelos animais de linhagens diferentes. Os autores verificaram que leucócitos hepáticos de camundongos C57BL/6 infectados produziram maiores quantidades de citocinas pró-inflamatórias, enquanto que IL-10 e TGF- β foram somente detectadas por leucócitos hepáticos de camundongos BALB/c. Curiosamente, uma maior expressão de TLR-2 e TLR-4 foi observada em hepatócitos de camundongos BALB/c infectados. Por outro lado, a

resposta pró-inflamatória observada nos animais C57BL/6 estava diretamente associada com expressão alta e constante de TLR-9 e iNOS. O pré-tratamento dos animais C57BL/6 com agonista de TLR-2 (Pam3CSK4) levou a redução dos níveis de atividade de transaminase bem como no número de focos inflamatórios no fígado dos mesmos. Demonstrando assim, um importante papel de TLR-2 na atenuação da intensa resposta inflamatória no fígado durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* (CARRERA-SILVA et al., 2010).

As vias de sinalização dos receptores Toll mediadas pela proteína adaptadora MyD88 não controlam a indução de resposta efetora mediada por linfócitos T CD8+. Neste contexto, animais geneticamente deficientes para TLR-2, TLR-4, TLR-9 ou MyD88 e infectados por *T. cruzi* geraram resposta citotóxica específica e linfócitos T CD8+ secretores de IFN- γ em níveis comparáveis com animais selvagem (OLIVEIRA et al., 2010).

A resposta imune humoral também pode constituir uma importante forma de se controlar a infecção, uma vez que a depleção de linfócitos B leva a aumento na parasitemia (KUMAR; TARLETON, 1998). Transferência adotiva de anticorpos de camundongos em estágios avançados da infecção por *T. cruzi* para camundongos conduz a uma rápida eliminação dos parasitas da circulação (BRODSKYN et al., 1989). Transferência de esplenócitos de animais que se recuperaram da fase aguda da infecção para animais confere proteção contra infecção letal por *T. cruzi*, a qual não acontece pela remoção dos linfócitos B, sendo relativamente insensível a remoção de linfócitos T ou macrófagos (SCOTT, 1981). Evidências sugerem que a maioria dos linfócitos B não apresenta especificidade ao parasita durante os estágios iniciais da infecção (MINOPRIO et al., 1988). Em um estudo inédito, onde se analisou resposta imune humoral policlonal e específica a infecção por *T. cruzi* em modelos animais de

resistência (C57BL/6) e suscetibilidade (BALB/c) foi verificado que a ativação policlonal de linfócitos B leva a repostas de hiper-IgG estando assim associada com aumento na suscetibilidade a infecção e reforça a importância da interação parasita-hospedeiro no desenvolvimento de uma resposta imune humoral específica (BRYAN; GUYACH; NORRIS, 2010).

A maioria dos dados publicados sobre a resposta imune foi obtida a partir de estudos com camundongos infectados com parasitas dos grupos *T. cruzi* II – VI, sendo que as diferenças genéticas entre *T. cruzi* I e *T. cruzi* II – VI são bastante significativas. Portanto, justificam-se estudos que avaliem a resposta imunológica contra cepas pertencentes ao grupo I. Recentemente, trabalho demonstrou que cepas pertencentes ao grupo I com diferentes capacidades infectivas induziram diferentes respostas imunes humoral e celular (ESPINOZA et al., 2010). Outro estudo comparando *T. cruzi* I e *T. cruzi* II mostrou que o padrão de resposta imune humoral estava relacionado com o genótipo do parasita, sendo que parasitas do grupo I eram mais eficientes em induzir super-expressão de todas as subclasses de IgG específicas (Dos SANTOS et al., 2009). Neste contexto, trabalhamos no laboratório com duas cepas de *T. cruzi*, a cepa G pertencente ao grupo I e a cepa CL pertencente ao grupo VI. Sabemos que formas tripomastigotas metacíclicas da cepa G apresentam baixa infectividade *in vitro* e nenhuma parasitemia *in vivo*. Enquanto que tripomastigotas metacíclicos da cepa CL são altamente infectivos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (revisado em YOSHIDA, 2006). Por outro lado, amastigotas extracelulares da cepa G apresentam alta infectividade *in vitro*, mas não induz parasitemia *in vivo* e os da cepa CL são pouquíssimos infectivos *in vitro* e promovem parasitemia patente *in vivo* (SILVA et al., 2006). Diante deste paradigma, uma pergunta é recorrente: Por que amastigotas extracelulares da cepa G que são altamente infectivos *in vitro* não promovem parasitemia em modelos murinos?

2.0 JUSTIFICATIVA

A falta aparente de diferenças entre pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas levaram a idéia de que populações particulares de parasitas conduziriam o estabelecimento das diferentes formas clínicas. Os estudos filogenéticos de cepas de *T. cruzi* mostraram que o parasita pode ser dividido em diferentes grupos filogeneticamente distintos sugerindo que estas populações podem influenciar características como tropismo tissular, manifestação da doença e resposta imunológica. Desta forma, a caracterização da suscetibilidade imunológica de parasitas pertencentes aos diferentes grupos se faz de extrema importância para que terapias baseadas na resposta imunológica sejam eficientes para todos os grupos filogeneticamente distintos. Vale a pena ressaltar que pacientes com doença de Chagas podem abrigar diferentes grupos de *T. cruzi* e que após transplantes ou imunossupressão severa estes parasitas podem reativar e causar sérios danos ao paciente. Neste contexto, foi observado que a frequência de parasitas do grupo I associados com danos cardíacos é significativamente alta (BURGOS et al., 2010).

Além disso, dar continuidade à caracterização funcional da P21 de *T. cruzi* por meio do emprego de sua forma recombinante (P21-His₆) também é de grande relevância, pois esta proteína poderá futuramente figurar entre os potenciais alvos terapêuticos para o tratamento da doença de Chagas.

3.0 OBJETIVO GERAL

Comparar a infecção *in vitro* e *in vivo* por amastigotas extracelulares de cepas de *T. cruzi* pertencente a diferentes grupos filogenéticos, bem como avaliar o potencial pró-fagocítico da P21-His₆.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a capacidade infectiva de amastigotas extracelulares das cepas G e CL *in vitro*;
- Avaliar a suscetibilidade de amastigotas extracelulares das cepas G e CL frente a diferentes componentes do sistema imunológico inato e adaptativo *in vivo*;
- Analisar o potencial de ativação da infecção por amastigotas extracelulares das cepas G em animais imunossuprimidos;
- Avaliar o potencial pró-fagocítico da P21-His₆;
- Identificar possíveis vias de sinalização ativadas pela P21-His₆ durante o processo de indução de fagocitose.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos e local de estudo

O estudo fez parte do projeto intitulado: “Estudos de moléculas envolvidas na invasão e tráfego intracelular das formas infectivas de *Trypanosoma cruzi* *in vitro* e *in vivo*. Emprego da P21 na indução de proteção contra a doença de Chagas.”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) (Protocolo número 059/08).

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular (Bloco 6T sala 07) do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU. Houve a colaboração dos Laboratórios de Virologia, Microbiologia, Parasitologia, Histologia, Instituto de Ciências Biomédicas, UFU. Os experimentos que utilizaram de animais nocautes foram realizados no laboratório do professor Dr. João Santana, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Escola de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

4.2 Cultura celular

Células Vero (fibroblastos de rim de macaco verde da África) foram utilizadas para manutenção do ciclo de *T. cruzi in vitro*. Células HeLa, células epiteliais derivadas de carcinoma de cérvix uterino e fibroblastos embrionários de murinos foram utilizadas para a realização de ensaios de invasão e multiplicação parasitária. Células L929, linhagem de fibroblastos de camundongos (OGLE; GUO, 1994), foram utilizadas em ensaio de “*release*”, liberação de parasitos. Todas as células foram cultivadas na presença de *Dulbecco's modified Eagle's medium*-DMEM (Vitrocell/Embriolife), com L-glutamina (2mM) e Dglicose (4500 mg/L), bicarbonato de sódio (2000 mg/L), HEPES (2380 mg/L), piruvato de sódio (1100 mg/L), suplementado com os antibióticos

penicilina (60 mg/L), gentamicina (40 mg/L) e estreptomicina (10 mg/L), e com soro fetal bovino-SFB (Vitrocell/Embriolife) a 10%, e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂.

4.3 Parasitos

Tripomastigotas de cultura das cepas G (YOSHIDA, 1983) e CL (BRENER; CHIARI, 1963) foram mantidos em células Vero, em meio DMEM, 10% SFB. Amastigotas extracelulares foram obtidos a partir da incubação de tripomastigotas em meio LIT (*“Liver Infusion Tryptose”*) pH 5.8, suplementado com 5% SFB, por 16 a 18 horas a 37°C (MORTARA, 1991).

4.4 Animais

Calomys callosus (cepa Canabrava) foram gentilmente cedidos pela Prof. Eloisa Amália Vieira Ferro, do instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, e mantidos em biotério de propriedade e responsabilidade da Prof. Dra. Eloisa. Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e seus respectivos animais iNOS^{-/-}, IL-12^{-/-}, TNF- α ^{-/-}, MyD88^{-/-}, IFN- γ ^{-/-}, e Balb/c selvagens e IL-18^{-/-} foram gentilmente cedidos pelo prof. Dr. João Santana da Silva, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Escola de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Os animais nocautes foram mantidos e manipulados em biotérios do Departamento de Bioquímica e Imunologia, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Santana.

Os animais foram mantidos em condições padrões de 12 horas de luz-12 horas na ausência de luz, em temperatura de 25 $\pm$ 2 °C, com comida e água *“ad libitum”*. Camundongos de 6 a 8 semanas foram os escolhidos para a realização dos

experimentos. Toda manutenção e manipulação dos animais foram de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animal (CEUA), UFU.

4.5 Ensaio de Multiplicação

Células HeLa e fibroblastos embrionários de murinos (MEF) foram plaqueadas na ordem de 10^5 células/poço em placas de cultura celular de fundo chato com 24 poços (TPP-92024) sobre lamínulas circulares de 13mm, e deixadas “*overnight*” em estufa de CO₂. Posteriormente, foram colocados amastigotas extracelulares das cepas G ou CL para invadirem tais células, na ordem de 15 parasitos/célula. Quatro horas pós-invasão, os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfatos- PBS 1x a 0,01 M, pH 7,2 (8 g/L de NaCl, 1,15 g/L de Na₂HPO₄, 0,2 g/L de KH₂PO₄, 0,2 g/L de KCl), para a retirada de parasitos não internalizados, e novo meio foi colocado. 24 e 48 horas pós-infecção as células foram fixadas com solução Bouin (formaldeído 23,8%, ácido acético 4,8% e ácido pícrico 71,4%), por 15 minutos, e coradas com solução Giemsa (5 gotas a cada 1 mL de água destilada), por 3 horas. Posteriormente, as lamínulas foram passadas rapidamente 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. Este processo foi realizado para a retirada do excesso de corante.

Para a análise da multiplicação parasitária, contou-se o número de parasitos internalizados (os quais possuíam um halo branco ao seu entorno) em um total de 100 células/ lamínula.

4.6 Ensaio de “*release*”- liberação de parasitos em sobrenadante

Células pluripotentes mielóides (da linhagem monocítica) foram extraídas da medula óssea de camundongos C57BL/6. Para a obtenção de tais células, retirou-se o fêmur do camundongo, com cuidado especial para que a cabeça do fêmur permanecesse intacta, e posteriormente, as extremidades do osso foram cortadas e foi injetado, com uma seringa, PBS estéril 1x na cavidade femoral. Desta forma, o PBS que passara na cavidade, estaria arrastando consigo células ali presente. Tais células foram colocadas em placas de Petri (BD, do tipo optilux, de dimensões 100x20mm, não tratadas, para possibilitar a aderência das células) com 10 mL de DMEM 20/30, o qual se constitui de 20% de SFB, e 30% de meio condicionado de células L929, as quais naturalmente secretam M-CSF, um fator de diferenciação de macrófagos (OGLE; GUO, 1994).

Uma vez diferenciadas, o que demora cerca de uma semana, tais células foram desaderidas das placas, por meio de choque-térmico (colocou-se a placa de Petri contendo as células em gelo, por cerca de dez minutos), e foram plaqueadas em placas de 96 poços, na ordem de 2×10^5 células/poço. Alguns dos poços foram, em seguida, tratados com IFN- γ nas concentrações de 10 ng/mL ou de 100 ng/mL. Poços não tratados foram usados como controle negativo. Posteriormente, amastigotas da cepa G ou CL foram adicionados nos poços, na ordem de 15 parasitos/célula. Após 4 horas, os poços foram lavados com PBS 1x estéril para retirada de parasitos não-internalizados e foi adicionado novo meio nas células. Ao longo de 10 dias foi contada a quantidade de tripomastigotas liberados no sobrenadante de cultura celular.

4.7 Ensaio de Multiplicação em macrófagos peritoneais

Para a extração de macrófagos peritoneais inflamatórios, 1mL de tioglicolato de Brewer a 3% (indutor de inflamação) foi injetado no peritônio de camundongos C57BL/6. Após 2 dias, os animais foram infectados intra-peritonealmente com AE das cepas G ou CL, na ordem de 10^5 parasitos/animal, e após 4 horas da infecção foram eutanasiados. Retirou-se a pele dos animais, revestindo o peritônio, e foi injetado neste 5 mL de meio DMEM e, após homogeneização, o meio foi recuperado por meio da aspiração com seringa. Os macrófagos obtidos neste aspirado foram plaqueados em placas de 24 poços com lamínulas circulares, na ordem de 2×10^5 células/poço. 48 e 72 horas pós-infecção, as lamínulas foram fixadas com solução Bouin, por 15 minutos, e coradas com Giemsa, por três horas. Quantificou-se o número de parasitos internalizados em um total de 100 células infectadas.

4.8 Análise *in vivo*- Infecção de animais selvagens e geneticamente deficientes

Camundongos Balb/c selvagens e seu respectivo IL-18^{-/-}, camundongos C57BL/6 selvagens e seus respectivos IL-12^{-/-}, IFN- γ ^{-/-}, TNF- α ^{-/-}, MyD88^{-/-} e iNOS^{-/-}, e *C. callosus* selvagens, de seis a oito semanas de idade, foram infectados com amastigotas extracelulares de *T. cruzi* das cepas G ou CL via intra-peritoneal (10^5 parasitos por camundongo), usando seringa de 1 mL. Acompanhou-se a parasitemia e a mortalidade de tais animais ao decorrer de 30 dias.

Para análise da parasitemia (quantidade de parasitos no sangue) dos camundongos, foi coletado da cauda 5 μ L de sangue, colocados em lâminas as quais foram lidas semanalmente. A sobrevivência dos animais pós-infecção foi acompanhada durante todos os dias do experimento.

4.9 Imunossupressão de camundongos infectados com amastigotas extracelulares das cepas G e CL

Camundongos C57BL/6 selvagens, de seis a oito semanas de idade, foram infectados com amastigotas extracelulares de *T. cruzi* das cepas G ou CL via intra-peritoneal (10^5 parasitos por camundongo), usando seringa de 1 mL. Após 10 dias um grupo destes animais foi imunossuprimido ao decorrer de todo o experimento com Decadron® (dexametasona) a 10 µg/mL em água, e colocado no bebedouro dos animais. Outro grupo não recebeu o tratamento, como controle. Acompanhou-se a parasitemia semanalmente e a sobrevida diariamente de tais animais ao decorrer de 30 dias.

Para análise da parasitemia (quantidade de parasitos no sangue) dos camundongos, foi coletado da cauda dos mesmos 5 µL de sangue, colocados em lâminas e estas lidas, varrendo-se a lamínula por inteiro.

4.10 Ensaio de invasão com tratamento de P21-His₆

Para análise da atuação da proteína P21 de *T. cruzi* durante a invasão de patógenos diversos, realizou-se um ensaio de invasão no qual macrófagos peritoneais de *C. callosus* foram obtidos a partir do recrutamento com tioglicolato (a metodologia fora descrita mais detalhadamente anteriormente, no item 3.6). Tais macrófagos foram plaqueados em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm, na ordem de 2×10^5 células/poço, e posteriormente incubados com AE da cepa G ou CL, outros com taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, cepa RH (cedidos gentilmente pela Dr^a Eloisa Amália Vieira Ferro) e outros ainda com promastigotas de *Leishmania amazonensis*, na ordem de 15 parasitos/célula, na presença ou ausência (controle negativo) de 40 µg/mL da proteína recombinante P21-His₆. Quatro horas após a infecção, as células foram

lavadas com PBS e as lamínulas fixadas e coradas com método de coloração rápida panótico (Instant-Prov, Newprov), o qual contém 3 soluções, a primeira fixadora e as demais de coloração (sendo as lamínulas incubadas 1 minuto com cada uma das soluções, de acordo com as instruções do fabricante). Foi contado o número de parasitos internalizados em um total de 100 células totais.

4.11 Análise da indução de Polimerização de actina por P21-His₆

Macrófagos peritoneais inflamatórios de *C. callosus* foram extraídos (metodologia descrita no item 3.6) e plaqueados em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares, na ordem de 2×10^5 /poço, e deixadas “*overnight*” para aderirem. Após foram tratadas ou não (grupo controle) com 40 µg/mL de P21-His₆. As células foram fixadas com formaldeído 4% em PBS 24 e 48 horas pós-tratamento com a proteína.

Para imunolocalização dos filamentos de actina, as lamínulas foram incubadas com faloidina-488 (fluorocromo de fluorescência verde, AlexaFluor 488), na proporção 1:500 em PGN-saponina (PBS + gelatina-0,2% + azida e saponina-0,1%) e com 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), na proporção de 1µL de DAPI para 200 µL de PBS-saponina, para visualização de núcleos, em câmara úmida e escura durante uma hora. Após, as lamínulas foram lavadas três vezes em PBS 1x e as lâminas foram montadas em glicerol tamponado com 0,1M Tris pH 8,6 e 0,1% parafenilenodiamina (PPD, agente “*anti-fading*”). Imagens foram adquiridas em aumento de 63x através de microscópio confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Germany), Zeiss Axiovert 200M, acoplado com sistema de aquisição de imagem digital. As imagens foram analisadas quanto a fluorescência no programa Image J.

4.12 Análise da ativação de PI3-quinase por P21-His₆

Macrófagos peritoneais de *C. callosus* foram extraídos (metodologia descrita no item 3.6) e plaqueados em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares, na ordem de 2×10^5 /poço, e deixadas “*overnight*” em estufa contendo 5% de CO₂ para aderirem. Após, foram tratadas ou não (grupo controle) com 40 µg/mL de P21-His₆ e incubadas ou não com 0,25 Mm de wortmanina (inibidor de PI3-quinase). As células foram fixadas com formaldeído 10% em PBS e após foi realizada imunofluorescência para imunolocalização dos filamentos de actina (como descrito no item 3.10) e as imagens foram adquiridas em aumento de 63x, através de microscópio confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Germany), Zeiss Axiovert 200M, acoplado com sistema de aquisição de imagens.

4.13 Ensaio de fagocitose de partículas de zimozan

Macrófagos peritoneais de *C. callosus* foram extraídos (metodologia descrita no item 3.6) e plaqueados em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares, na ordem de 10^5 células/poço. Para análise do processo inespecífico de fagocitose induzido por P21-His₆, adicionou-se às células partículas de zimozan, na ordem de 20 partículas/célula, totalizando-se 2×10^6 /poço. As células foram tratadas com 40 µg/mL da proteína P21-His₆ nos tempos de uma hora, 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Um grupo de células foi incubado somente com as partículas (grupo controle), de forma que as demais foram incubadas com as partículas e concomitantemente com a proteína.

Após, as lamínulas foram retiradas nos devidos tempos e fixadas com Bouin, por 15 minutos, e posteriormente coradas com Giemsa por 3 horas. 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 entelan em lâminas para a posterior leitura em microscópio ótico. Quantificou-se o número de partículas internalizadas em um total de 100 células por lamínula.

4.14 Normas de biossegurança

Todo procedimento *in vitro* e *in vivo*, envolvendo manuseio dos parasitos, de animais infectados, bem como a utilização dos equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo (2005).

4.15 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata de pelo menos três experimentos independentes. A significância dos experimentos foi determinada pelo método ANOVA, realizado através do programa VassarStats program (©Richard Lowry 1998-2006), disponível na webpage <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>, ou ainda pelo GraphPad Prism (©GraphPad Software Inc, 1992-2007) versão 5.01. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. A análise de sobrevida foi realizada pela curva de sobrevivência de acordo com o programa GraphPad Prisma.

5.0 RESULTADOS

5.1 Análise da diferença de infectividade de amastigotas extracelulares das cepas G e CL

5.1.1 Análise da diferença no perfil de infectividade de amastigotas extracelulares das cepas G e CL, comparando infecções *in vitro* e *in vivo*

A partir dos resultados obtidos no ensaio de multiplicação parasitária, no qual células epiteliais tumorais (HeLa) e fibroblastos embrionários murinos (MEF) foram infectadas com amastigotas extracelulares da cepa G ou CL, e o número de parasitos intracelulares foi contado após 24 e 48 horas, observamos o maior perfil infectivo, *in vitro*, de amastigotas da cepa G em relação à CL.

Ao analisarmos a figura 1, observamos que, 24 horas pós-infecção (figura 1A), o número de parasitos da cepa G internalizados em células HeLa foi maior que o da cepa CL ($p<0,05$), assim como em células MEF ($p<0,01$). O mesmo observa-se após 48 horas (figura 1B), sendo que houve maior índice de multiplicação parasitária da cepa G em HeLa e MEF ($p<0,01$), em relação à cepa CL. Também podemos notar a tendência no aumento do número de parasitos internalizados ao decorrer do tempo, sendo que, para ambas as cepas, o número de parasitos foi maior após 48 horas em relação às 24 horas pós-infecção. Contudo, tal aumento mostrou-se estatisticamente significativo apenas nas células MEF, tanto para a cepa G ($p<0,05$) quanto para a CL ($p<0,05$).

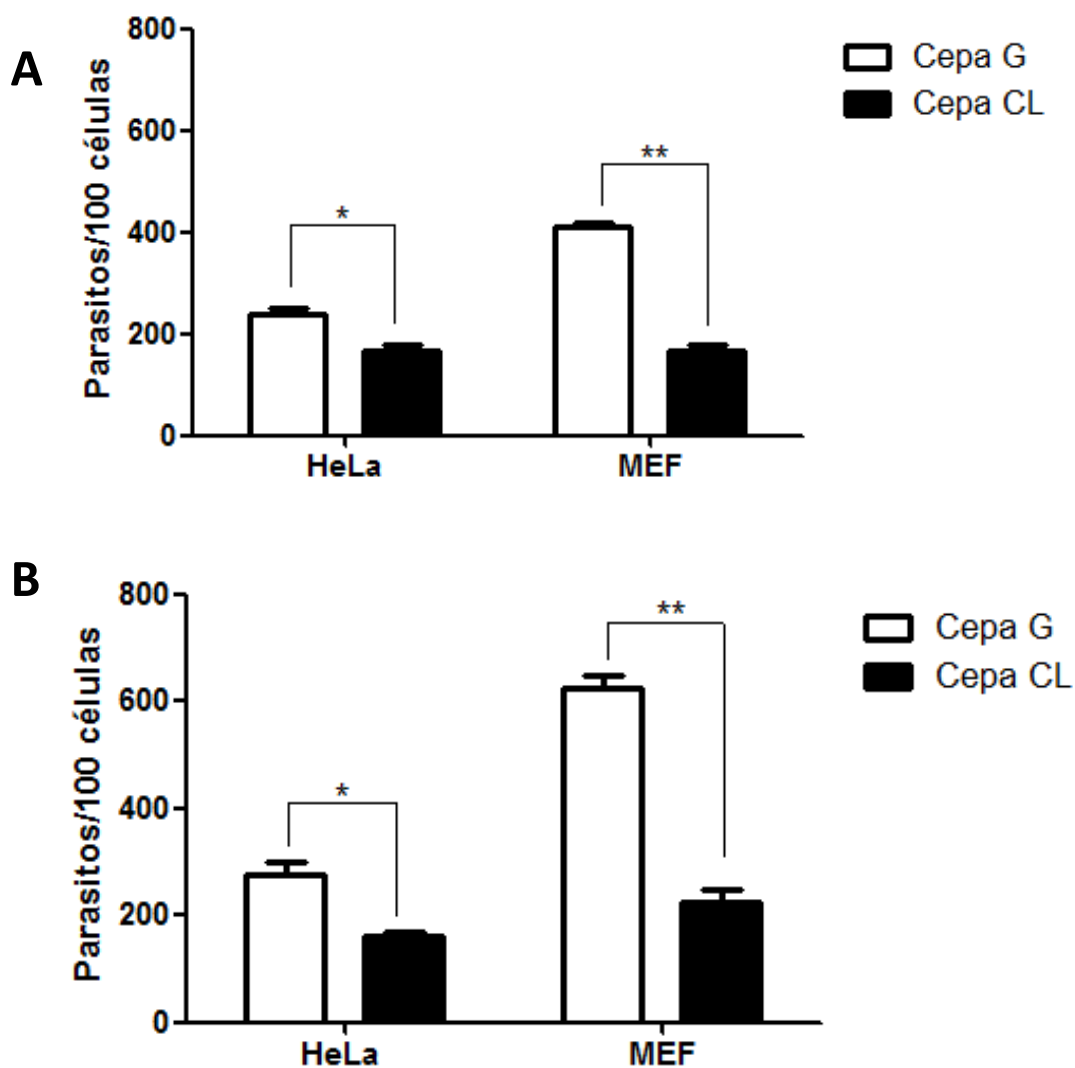


Figura1: Ensaio de multiplicação de amastigotas extracelulares das cepas G e CL em células HeLa e MEF. Após 24 horas, houve maior multiplicação parasitária da cepa G em relação à CL, tanto em células HeLa (* $p < 0,05$), quanto em MEF (** $p < 0,01$). Esta tendência se manteve após 48 horas, observando-se maior número de parasitos intracelulares da cepa G (HeLa: * $p < 0,05$; MEF: ** $p < 0,01$). Análise estatística: Two-way ANOVA.

Contudo, em relação à infecção *in vivo*, observamos o oposto, sendo que camundongos Balb/c e C57BL/6, quando infectados com amastigotas extracelulares da cepa G, apresentaram ausência de parasitemia ao decorrer de 30 dias, figura 2A e 2B, respectivamente. Diferentemente, camundongos infectados com a cepa CL apresentaram parasitemia significativa, indicando a fase aguda da doença.

A identificação de tripomastigotas da cepa CL presentes na corrente sanguínea de ambos camundongos iniciou-se a partir do 7º dia pós-infecção. O pico de parasitemia em animais C57BL/6 ocorreu aproximadamente no 20º dia pós-infecção, com média no total de parasitos sendo de 90 tripomastigotas a cada 5 µL de sangue, o proporcional de 18.000 parasitos/mL de sangue. O pico de parasitemia em BALB/c ocorreu aproximadamente no 14º dia pós-infecção, com a média do total de parasitos sendo 120 tripomastigotas a cada 5 µL de sangue, o proporcional de 24.000 parasitos/mL de sangue .

Como a figura 3 demonstra, *C. callosus* infectados com amastigotas extracelulares de ambas as cepas, G e CL, apresentaram parasitemia significativa para a cepa CL e parasitemia sub-patente para a cepa G.

A parasitemia induzida pela cepa CL iniciou-se no 7º dia pós-infecção e apresentou pico no 23º dia, com a média do número máximo de parasitos sendo 50 a cada 5 µL de sangue do animal, sendo proporcional a 10.000/ mL de sangue. A parasitemia induzida pela cepa G iniciou-se posteriormente, a partir do 13º dia pós-infecção, e teve seu pico também ao 23º dia, com média do número máximo de parasitos significativamente menor que o da cepa CL ($p < 0,001$), sendo de 12 parasitos a cada 5 µL de sangue do animal, proporcional a 2400 parasitos/mL de sangue. Dentre os modelos animais que escolhemos para o desenvolvimento do trabalho (BALB/c, C57BL/6 e *C. callosus*), *C. callosus* foi o único no qual se detectou, ainda que em baixa

quantidade, parasitos da cepa G na corrente sanguínea, indicando que tal cricetídeo mostra-se adequado para o estudo de cepas de baixa virulência.

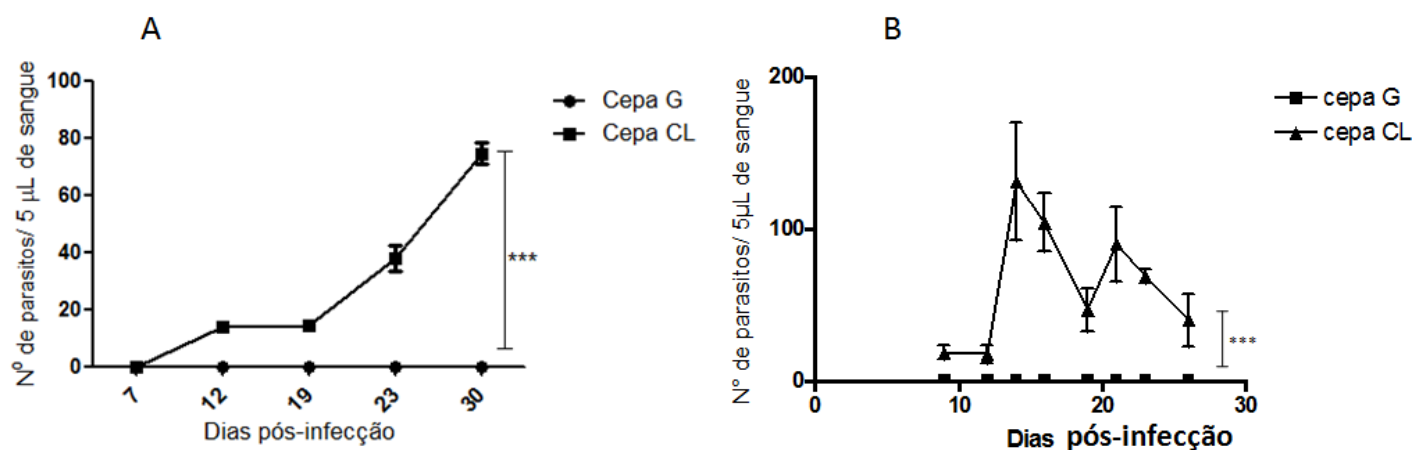


Figura 2: Parasitemia de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com amastigotas extracelulares das cepas G ou CL. Houve ausência de parasitemia da cepa G em ambos os camundongos. C57BL/6 (A) apresentaram parasitemia para a cepa CL, com o pico ocorrendo aproximadamente no 20º dia p.i. BALB/c (B) também apresentaram parasitemia para esta cepa, com o pico ocorrendo aproximadamente no 14º dia p.i. Houve diferença estatisticamente significativa entre a parasitemia apresentada pela cepa CL em relação à cepa G (em ambos camundongos, C57BL/6 e BALB/c, a diferença foi altamente significativa:*** $p < 0,001$). Análise estatística: One-way ANOVA, “*post-test*” Teste de Comparação Múltipla Bonferroni.

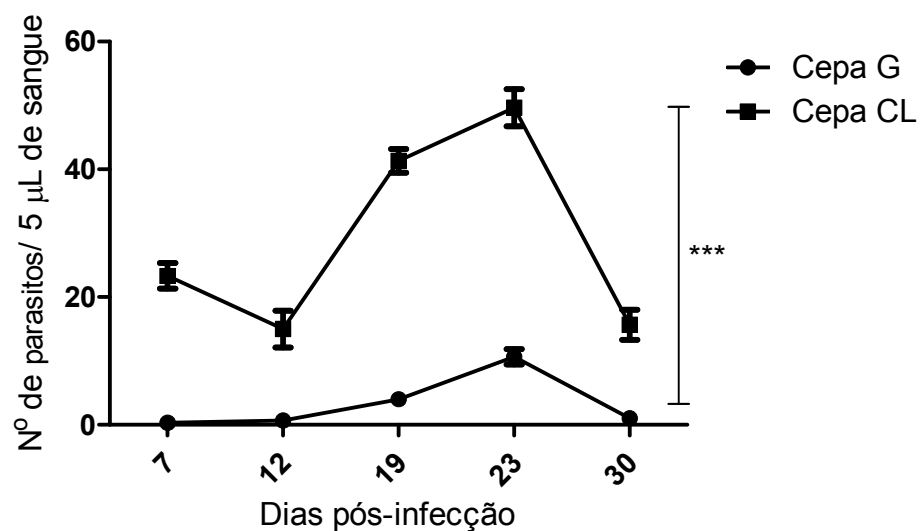


Figura 3: Parasitemia de Camundongos *Calomys callosus* infectados com amastigotas extracelulares das cepas G ou CL. A parasitemia induzida pela cepa CL iniciou-se no 7º dia pós-infecção e apresentou seu pico no 23º dia. A parasitemia induzida pela cepa G iniciou-se posteriormente, a partir do 13º dia pós-infecção, e teve seu pico também ao 23º dia. Houve diferença estatisticamente significativa entre a parasitemia apresentada pela cepa CL em relação à cepa G (**p<0,001). Análise estatística: One-way ANOVA.

5.1.2 Análise *in vitro* da possível susceptibilidade da cepa G a atuação de macrófagos

Com o intuito de observarmos a atuação de mecanismos da resposta imune do hospedeiro à infecção por amastigotas extracelulares (AE) das cepas G e CL, tais como a atividade de macrófagos e sua ativação pela citocina pró-inflamatória IFN- γ , realizamos primariamente a infecção de macrófagos peritoneais extraídos de camundongos C57BL/6. A infecção foi realizada *in vivo*, intra-peritonealmente, para que os mecanismos de ativação de macrófagos do hospedeiro atuassem durante a parasitose. Somente após, os macrófagos foram extraídos e foram plaqueados e o restante do experimento realizado *in vitro*. Observamos na figura 4A que amastigotas extracelulares da cepa G multiplicaram-se menos em macrófagos peritoneais, em relação àqueles da cepa CL, significativamente 72 horas pós-infecção ($p < 0.001$), possibilitando predizer que a cepa G mostra-se mais susceptível à atuação de macrófagos, um dos mecanismos da resposta imune inata, em relação à cepa CL.

Para dar sustentabilidade aos resultados obtidos acima, realizamos um experimento no qual macrófagos foram diferenciados *in vitro*, infectados com AE de ambas as cepas e estimulados com IFN- γ a diferentes concentrações, de 10 ou 100 ng/mL. Posteriormente, a quantidade de tripomastigotas liberados no sobrenadante foi contada ao longo de 10 dias pós-infecção. Apresentamos os gráficos apenas dos dias 5 (4B) e 7 (4C) pós-infecção, por terem apresentado os resultados mais significantes. Na figura 4B e 4C, observamos que a quantidade de tripomastigotas da cepa G, liberados no sobrenadante de cultura, foi significativamente menor em macrófagos estimulados por IFN- γ , tanto na concentração de 10 ng/mL (5º dia: $p < 0,001$; 7º dia: $p < 0,01$) quanto na maior concentração, de 100 ng/mL (5º dia: $p < 0,001$; 7º dia: $p < 0,001$), em relação a macrófagos não estimulados. Após 5 dias da infecção, não se observa diferença

estatisticamente significativa entre a quantidade de parasitos detectados após estimulação com 10 ou 100 ng/mL, indicando que a menor concentração da citocina já é suficiente para induzir de forma eficaz a ativação dos macrófagos. Contudo, no 7º dia pós-infecção, percebemos uma ligeira diferença entre as concentrações de tratamento, sendo que a maior concentração (100 ng/mL) foi, logicamente, mais eficaz, eliminando maior número de parasitos ($p < 0,001$) que a menor concentração ($p < 0,01$). Apesar da observada tendência na diminuição de parasitos da cepa CL após estimulação com a citocina, não observamos diferença estatisticamente significativa entre os números de tripomastigotas liberados em macrófagos estimulados (tanto com 10 ou 100 ng/mL da citocina) em relação àqueles não estimulados. Isso nos permite prever que a cepa G mostra-se mais susceptível à tal mecanismo da resposta hospedeira. Contudo, tal resultado pode estar relacionado a baixa detecção em sobrenadante de tripomastigotas da cepa CL, mesmo em cultura de macrófagos não estimulados. Esse fato provavelmente ocorreu devido à menor infectividade de amastigotas da cepa CL *in vitro* em comparação aos da cepa G.

Sendo assim, a partir dos resultados citados acima, pode-se concluir que ambas as cepas, no entanto mais significativamente a cepa G, mostram-se susceptíveis a atuação de macrófagos, sendo a ativação destes por IFN- γ essencial para sua atividade perante tal infecção. Isso nos permite indicar que, possivelmente, a cepa G seja pouco infectiva *in vivo* devido a sua maior susceptibilidade a este mecanismo.

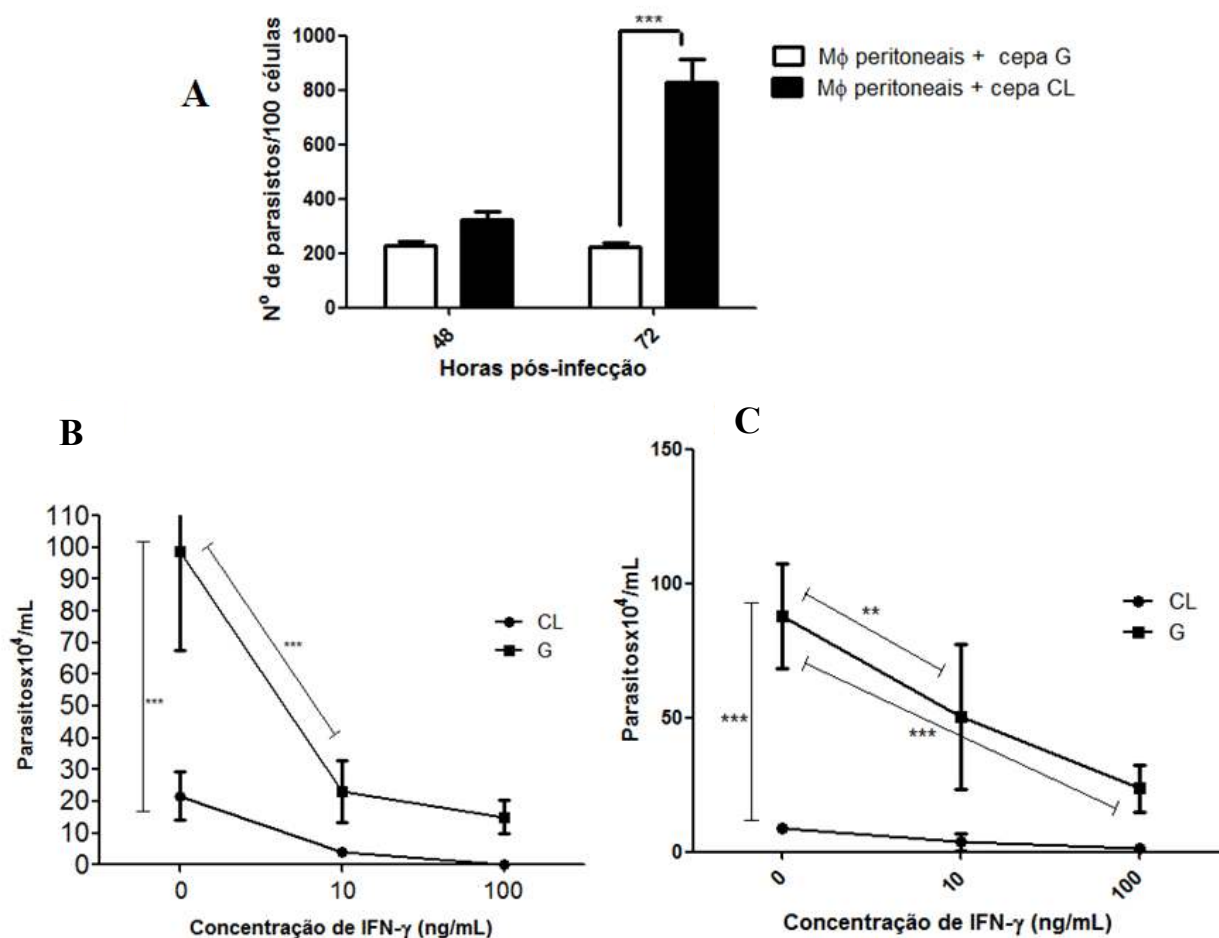


Figura 4: (A) Ensaio de multiplicação de amastigotas extracelulares das cepas G e CL em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6. O número de parasitos internalizados nas células foi contado em um total de 100 células infectadas, após 48 e 72 horas da infecção. AE da cepa G multiplicaram-se menos do que aqueles da cepa CL, sendo a diferença estatisticamente significante somente 72 horas pós-infecção (** $p < 0,001$). (B e C) Gráficos de ensaio de liberação. (B) Número de parasitos liberados em sobrenadante 5 dias pós-infecção. Houve diferença significativa no número de parasitos liberados da cepa G após estímulo dos macrófagos com 10 (** $p < 0,001$) e 100 ng/mL da citocina (** $p < 0,001$). Não houve diferença significativa para a cepa CL em nenhuma das concentrações de tratamento. (C) Número de parasitos liberados em sobrenadante 7 dias pós-infecção. Houve diferença significativa no número de parasitos liberados da cepa G após estímulo dos macrófagos com 10 (** $p < 0,01$) e 100 ng/mL da citocina (** $p < 0,001$). Não houve diferença significativa para a cepa CL em nenhuma das concentrações de tratamento. Análise estatística: One-way ANOVA, “*post-test*” teste de comparação Múltipla de Tukey.

5.1.3 Análise *in vivo* dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro na resposta a amastigotas extracelulares das cepas G e CL

Para maior compreensão dos mecanismos da resposta imune envolvidos na diminuição da infectividade da cepa G *in vivo*, utilizamos camundongos geneticamente deficientes para as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-18 e IL-12, para MyD88, e para iNOS. Tais camundongos foram infectados com amastigotas extracelulares da cepa G ou CL (sendo os animais IFN- $\gamma^{-/-}$ e IL-18 $^{-/-}$ infectados apenas com a cepa G) e a parasitemia e porcentagem de sobrevivência dos mesmos, analisadas.

Ambos resultados de parasitemia e porcentagem de sobrevivência dos camundongos demonstram que animais geneticamente deficientes para as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-12, assim como para iNOS e MyD88 são mais susceptíveis à infecção pela cepa CL em relação aos animais selvagens (WT). Camundongos TNF- $\alpha^{-/-}$ apresentaram maior parasitemia em relação aos WT (figura 5A: $p < 0,001$), sendo a média do número máximo de tripomastigotas detectados em 5 μ L de sangue, de 164. Além disso, os animais TNF- $\alpha^{-/-}$ apresentaram menor sobrevida que os selvagens (figura 5F: $p < 0,001$), sendo que iniciaram a morrer no 18º dia pós-infecção (p.i.), e apresentaram sobrevida até o 24º dia. Já os camundongos selvagens apresentaram pequena porcentagem de mortalidade (40%), ao 25º dia p.i, no entanto a maioria dos animais permaneceu vivo ao final do experimento. Camundongos IL-12 $^{-/-}$ também apresentaram maior e precoce parasitemia em relação aos WT (figura 5B: $p < 0,001$), sendo a média do número máximo de parasitos encontrados de 111/5 μ L de sangue. A sobrevida destes animais foi significativamente menor que a de selvagens (figura 5G: $p < 0,001$), sendo que iniciaram a morrer a partir do 17º dia p.i., e no 18º dia nenhum encontrava-se vivo. Camundongos iNOS $^{-/-}$ apresentaram mortalidade semelhante a de IL-12 $^{-/-}$ (figura 5H: $p < 0,001$), iniciando ao 17º dia e terminando ao 18º dia pós-infecção. Estes animais apresentaram precocemente maior

parasitemia que os selvagens (figura 5C: $p<0,001$), quando comparamos o número máximo de parasitos detectados (44/5 μ L de sangue) no último dia em que realizamos parasitemia destes animais (12° dia), com o de animais selvagens também neste dia (8/5 μ L de sangue). Não podemos comparar a quantidade de parasitos detectados nesses animais geneticamente deficientes com o pico de parasitemia dos animais selvagens, já que os iNOS $^{-/-}$ morreram precocemente e não alcançaram o dia de seu pico parasitêmico. Animais MyD88 $^{-/-}$ apresentaram elevada parasitemia (figura 5D: $p<0,001$) e menor sobrevivência (figura 5I: $p<0,001$), comparando-se com animais WT, sendo que estes morreram a partir do 18° dia p.i.e no 21° nenhum encontrava-se vivo. Estes resultados indicam que tais mecanismos são importantes no controle da infecção por *T. cruzi* da cepa CL.

Em relação à cepa G, somente os animais IL-12 $^{-/-}$ e IFN- $\gamma^{-/-}$ mostraram-se mais susceptíveis a infecção, sendo que os animais selvagens e os demais geneticamente deficientes não apresentaram qualquer parasitemia. A parasitemia observada nos IL-12 $^{-/-}$ foi momentânea, sendo detectada apenas no 12° dia p.i. e desaparecendo posteriormente. Contudo, foi significativamente maior que a apresentada em animais selvagens (5B: $p<0,001$). Já a parasitemia em IFN- $\gamma^{-/-}$ foi detectada desde o primeiro dia de análise (7° dia pós-infecção) e aumentou progressivamente ao decorrer dos 30 dias (5E: $p<0,001$). A alta parasitemia promoveu a morte precoce de tais animais (5J: $p<0,001$), a partir do 20° dia, sendo que ao 24° nenhum encontrava-se vivo, diferentemente dos selvagens que encontravam-se vivos ao final do experimento. Tais resultados indicam que estas citocinas pró-inflamatórias mostram-se decisivas no controle da cepa G de *T. cruzi*, já os demais mecanismos analisados mostram-se indispensáveis na resposta hospedeira à cepa G. Camundongos IL-18 $^{-/-}$ também foram infectados somente com amastigotas extracelulares da cepa G, buscando-se observar sua possível atuação na produção de IFN- γ , em

complementação à atividade de IL-12. Estes não apresentaram qualquer parasitemia ou menor sobrevida (dados não mostrados).

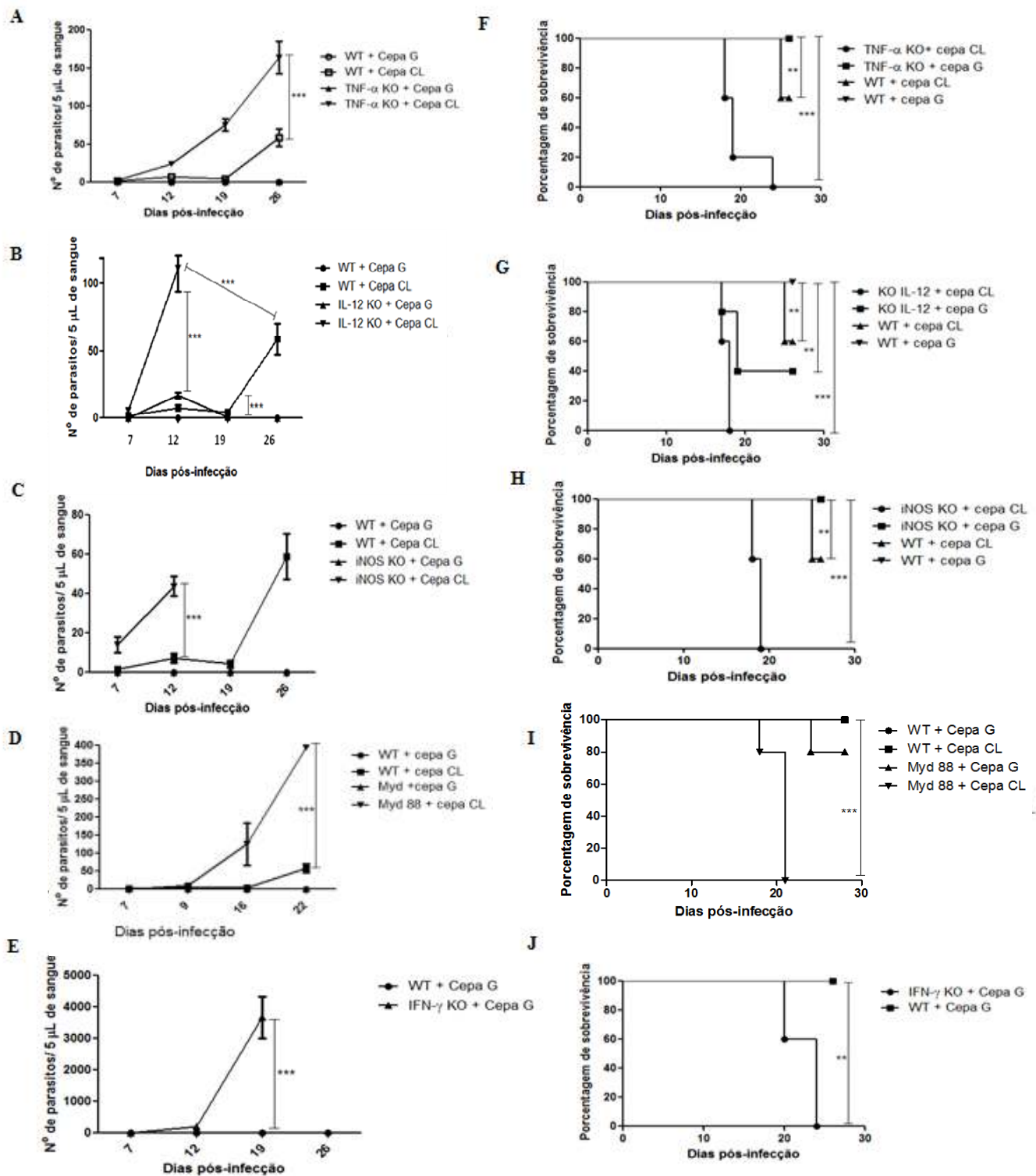


Figura 5: Parasitemia e Porcentagem de sobrevivência de Camundongos C57BL/6 WT (selvagens), e $\text{TNF-}\alpha^{-/-}$ (A e F), $\text{IL-12}^{-/-}$ (B e G), $\text{iNOS}^{-/-}$ (C e H), $\text{Myd-88}^{-/-}$ (D e I) e $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ (F e J) infectados com amastigotas extracelulares das cepas G ou CL. WT: selvagem; KO: nocautes /geneticamente deficientes. Os animais $\text{TNF-}\alpha^{-/-}$, $\text{IL-12}^{-/-}$, $\text{iNOS}^{-/-}$ e $\text{Myd-88}^{-/-}$ infectados com a cepa CL, apresentaram maior parasitemia e menor sobrevida que os animais selvagens ($***p<0,001$). Somente os animais $\text{IL-12}^{-/-}$ e $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ apresentaram parasitemia significativa ($***p<0,001$) e menor sobrevida ($**p<0,01$), ao serem infectados com a cepa G. Análise estatística: One-way ANOVA, “post-test” Teste de Comparação Múltipla Bonferroni. Análise de curva de sobrevivência.

5.1.4 Análise da possível ativação da infecção por amastigotas extracelulares da cepa G em animais imunossuprimidos

Para comprovarmos a ativação de cepas de baixa virulência durante processo de imunossupressão, infectamos camundongos C57BL/6 com amastigotas extracelulares das cepa G ou CL, imunossuprimindo alguns deles com Decadron® (dexametasona). A parasitemia e mortalidade foram acompanhadas ao longo de 30 dias.

A figura 6 nos mostra que camundongos imunossuprimidos e infectados com a cepa CL apresentaram precocemente seu pico de parasitemia, por volta do 18º dia pós-infecção (p.i.), apresentando, conseqüentemente, maior índice parasitário em relação aos camundongos não imunossuprimidos (figura 6A: $p<0,001$). Em decorrência desta precoce parasitemia, a mortalidade de tais animais foi também precoce (figura 6B: $p<0,01$), iniciando no 20º dia p.i, sendo que no 25º dia todos encontravam-se mortos. Camundongos infectados com a cepa G e que foram imunossuprimidos também apresentaram parasitemia significativa ((figura 6A $p<0,001$), contrastando com a ausência de parasitemia apresentada pelos não imunossuprimidos. Conseqüentemente, a mortalidade destes primeiros animais foi maior que aquela apresentada pelos não tratados (figura 6B: $p<0,05$), iniciando-se ao 25º dia.

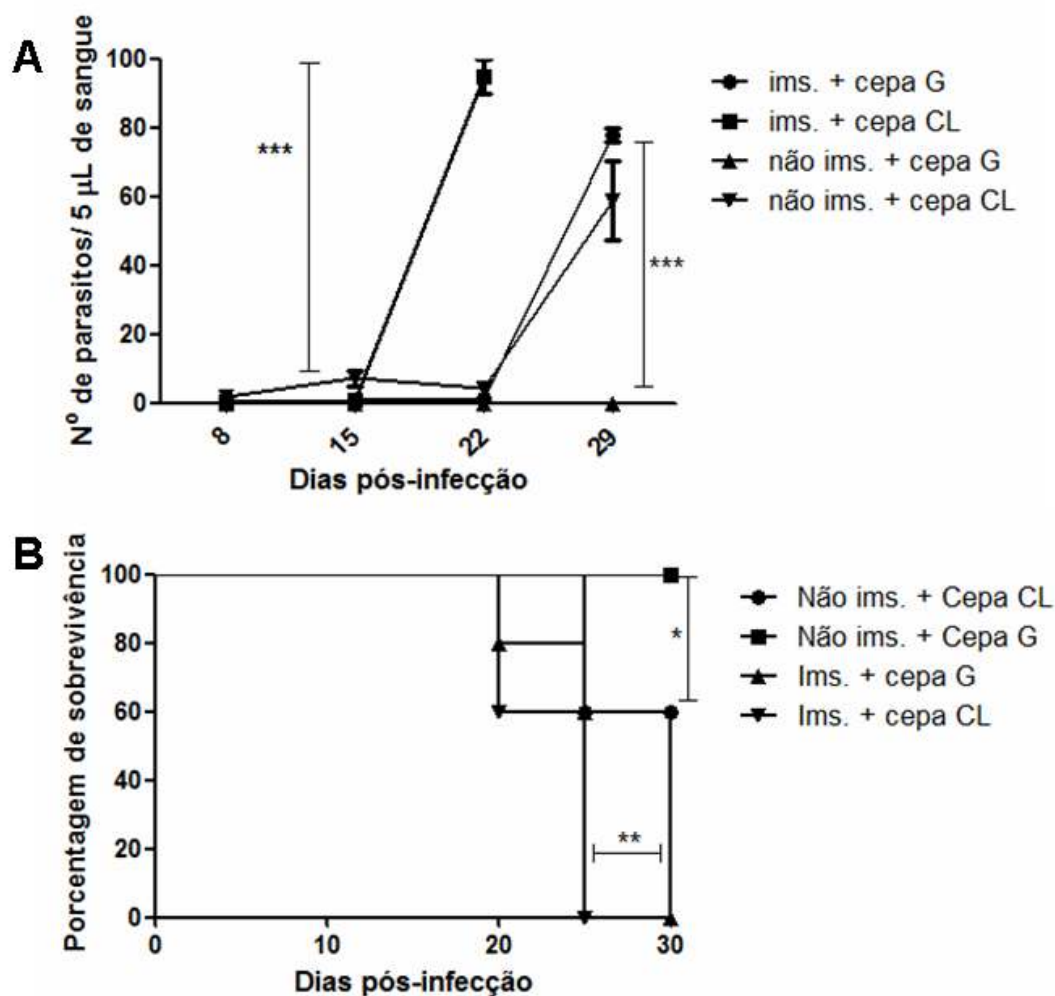


Figura 6: (A) Parasitemia e (B) Porcentagem de sobrevivência de Camundongos C57BL/6 WT (selvagens) infectados com amastigotas extracelulares das cepas G e CL, imunossuprimidos (ims) ou não (não ims), com Decadron® (dexametasona). A parasitemia e porcentagem de sobrevivência foram acompanhadas ao decorrer de 30 dias pós-infecção (p.i.). Os animais imunossuprimidos, tanto infectados com a cepa G quanto com a cepa CL, apresentaram parasitemia significativamente maior que aqueles não imunossuprimidos (***) $p < 0,001$, para ambas as cepas). A mortalidade também foi diferente nestes animais que receberam o tratamento (CL: ** $p < 0,01$, G: * $p < 0,05$). Análise estatística: One-way ANOVA, "post-test" Teste de Comparação Múltipla Bonferroni. Análise de curva de sobrevivência.

5.2 Análise do Possível Potencial Pró-fagocítico de P21-His₆

5.2.1 Avaliação da atividade de P21-His₆ na invasão de diferentes patógenos

Para observarmos a atuação da forma recombinante da proteína P21 de *Trypanosoma cruzi* na invasão de patógenos diversos, realizamos ensaio de invasão no qual macrófagos peritoneais de *C. callosus* foram tratados ou não com 40 µg/ml P21-His₆ e incubados com amastigotas de *T. cruzi* da cepa G, ou promastigotas de *Leishmania amazonensis*, ou ainda taquizoítas de *Toxoplasma gondii*. Os resultados plotados em gráficos, demonstrados na figura 7, indicam que o tratamento com a proteína no momento da infecção parasitária aumentou tanto a invasão de *T. cruzi*, o parasito que ubiquamente a expressa (A: $p < 0,001$), quanto de *L. amazonensis* (B: $p < 0,001$) e de *T. gondii* (C: $p < 0,01$), que não expressam P21. Este fato indica que P21 não tem sua ação específica a *T. cruzi*, mas é capaz de atuar na invasão de patógenos diversos.

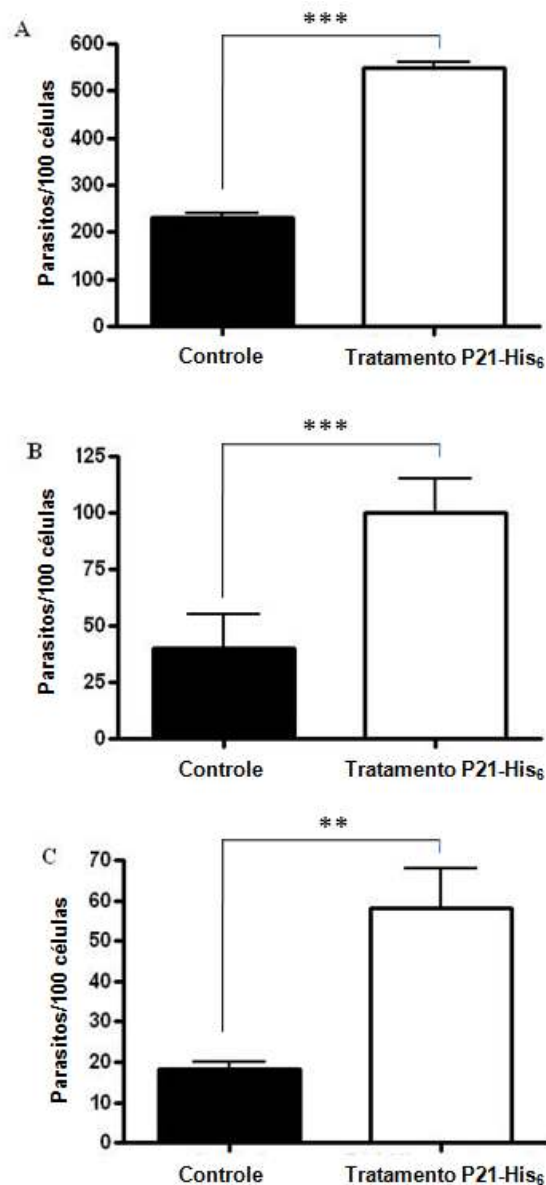


Figura 7: Ensaio de invasão de *T. cruzi*, *L. amazonensis* e *T. gondii* em macrófagos peritoneais inflamatórios na presença ou ausência de P21-His₆. Macrófagos de *Calomys callosus* foram infectados com amastigotas extracelulares da cepa G de *T. cruzi* (A), *L. amazonensis* (B) ou *T. gondii* (C), e tratados ou não com P21-His₆. Os resultados indicam que o tratamento com a proteína levou ao aumento da invasão dos três patógenos: *T. cruzi* (***) $p < 0,001$), *L. amazonensis* (***) $p < 0,001$) e *T. gondii* (**) $p < 0,01$). Análise estatística: One-way ANOVA.

5.2.2 Análise da indução inespecífica de fagocitose induzida por P21-His₆

Ao observarmos no experimento anterior a atuação de P21 na invasão de outros protozoários que não *T. cruzi*, perguntamo-nos se esta proteína seria de fato um indutor de fagocitose inespecífico. Para compreendermos esta questão, realizamos um ensaio de invasão no qual macrófagos de *C. callosus* foram incubados com partículas de zimozan, e tratados ou não com P21-His₆.

Na figura 8 notamos que após todos os tempos de tratamento com P21-His₆ (uma hora, 3, 6, 12, 24 e 48 horas), houve aumento significativo na fagocitose de zimozan ($p < 0,001$), em comparação à macrófagos não tratados. Tal fato mostra-nos que a forma recombinante da proteína P21, ubíquota de *T. cruzi*, induz o processo fagocítico independentemente da característica do agente a ser fagocitado, ou seja, inespecificamente.

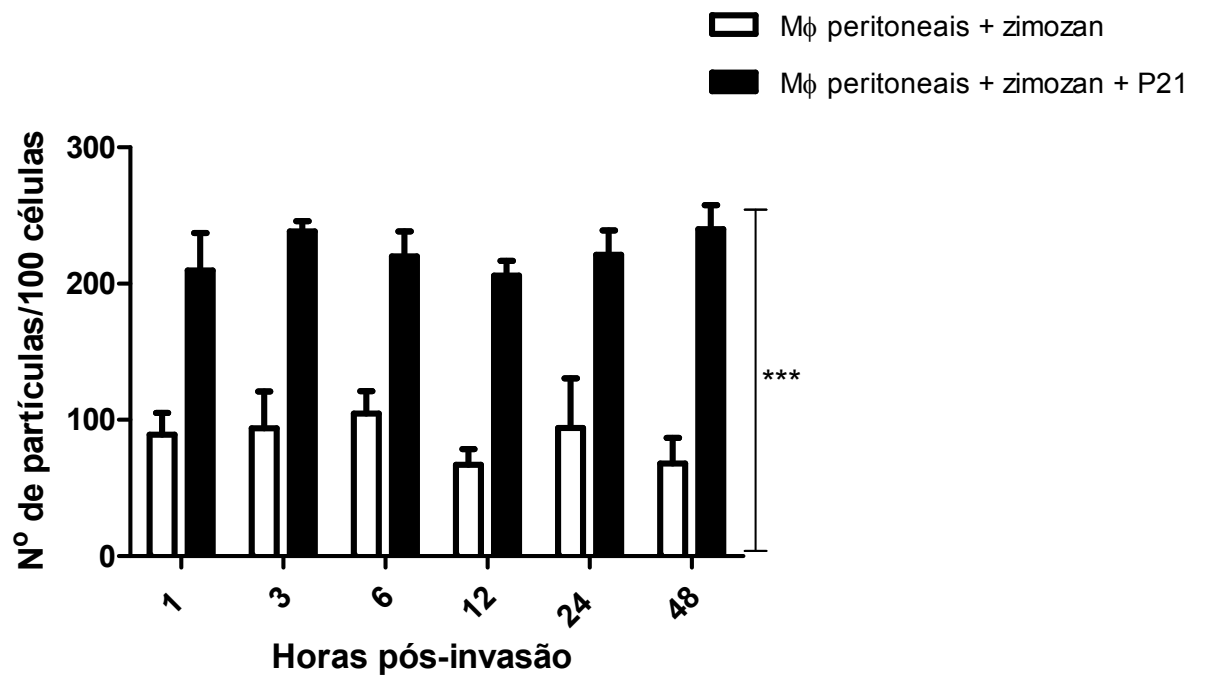


Figura 8: Ensaio de invasão com partículas de zimozan. Tratamento com P21-His₆ foi capaz de aumentar o processo fagocítico da partícula após todos os tempos, uma hora, 3, 6, 12, 24 e 48 horas, de tratamento de forma similar (***) $p < 0,001$). Análise estatística: Two-way ANOVA. “*Post test*” Bonferroni.

5.2.3 Análise da atuação de P21-His₆ no citoesqueleto de actina celular

Após observarmos o efeito de P21-His₆ na invasão de patógenos, assim como na indução de fagocitose de partículas de zimozan, buscamos compreender melhor esta atuação. Fizemos, portanto, o questionamento se a proteína poderia atuar na reestruturação do citoesqueleto de actina celular, que se mostra um processo fundamental na invasão de parasitos diversos e processo fagocítico celular. Buscando responder tal questão, macrófagos peritoneais foram extraídos de *C. callosus* e tratados ou não com 40 µg/ml da proteína, durante 24 e 48 horas. Após, as lamínulas foram fixadas e marcadas com faloidina-488, a qual se liga a actina celular.

Observamos, na figura 9A, o aumento na polimerização e reestruturação da actina celular em macrófagos tratados com a proteína recombinante em relação àqueles não expostos a mesma, indicando sua possível interferência na remodelação do citoesqueleto celular e, consequentemente, na internalização e invasão parasitária. Confirmando este aumento, a intensidade de fluorescência observada nas imagens foi determinada pelo programa Image J. A figura 9B mostra que houve aumento de fluorescência, o que indica o aumento da polimerização de actina, tanto após 24 horas ($p < 0,01$), contudo mais significativamente após 48 horas ($p < 0,0005$).

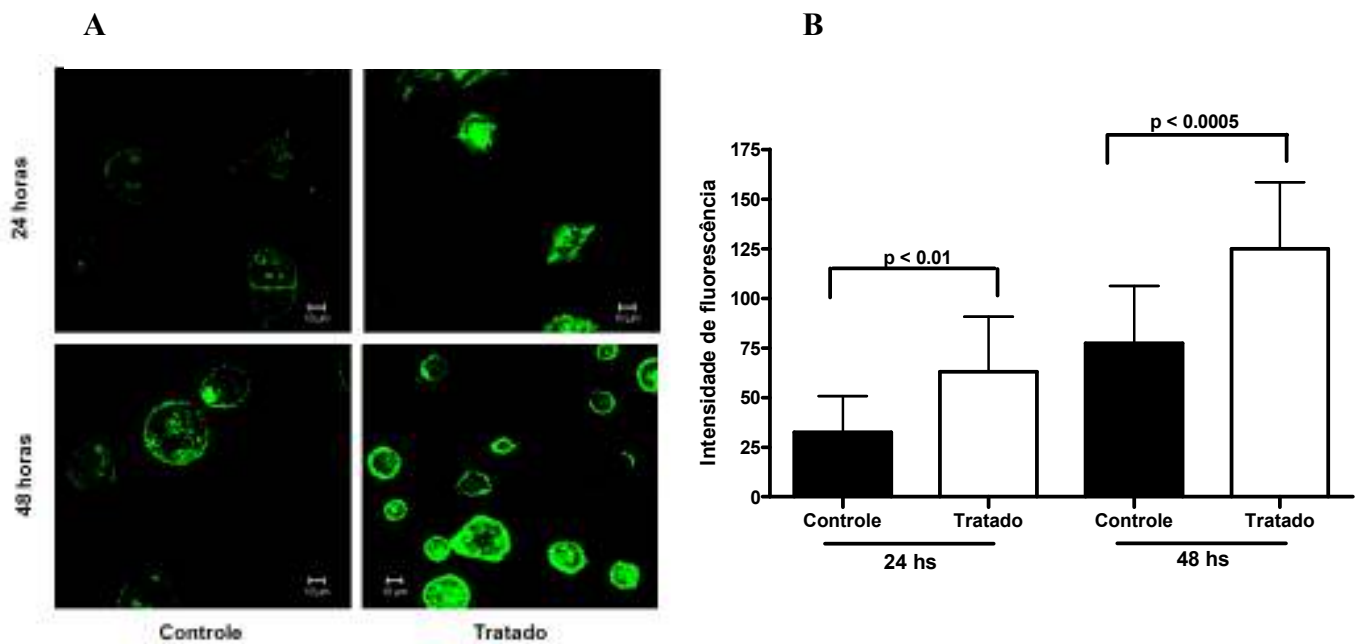


Figura 9: (A) Ensaio de imunofluorescência em macrófagos peritoneais tratados ou não com P21-His₆. Macrófagos peritoneais de *Calomys callosus* foram tratados ou não com P21-His₆ por 24 e 48 horas, e a actina celular foi marcada com faloidina-488. Houve aumento na marcação de actina após tratamento, principalmente após 48 horas, indicando o aumento da polimerização do citoesqueleto celular. (B) Intensidade de fluorescência medida no experimento anterior. O aumento da fluorescência foi determinada pelo programa Image J. Houve o aumento após tratamento com a proteína, tanto após 24 horas ($p < 0,01$). Análise estatística: One-way ANOVA.

5.2.4 Análise da possível interação de P21-His₆ com a via de sinalização de PI3-quinase

Ao buscarmos compreender como se daria a atuação de P21 na célula hospedeira, perguntamo-nos: qual via de sinalização esta proteína é capaz de ativar e, assim, promover a reestruturação do citoesqueleto celular resultando na internalização do parasito na célula? Sendo assim, realizamos experimento no qual macrófagos peritoneais de *C. callosus* foram tratados ou não (controle) com P21-His₆, e algumas das células foram tratadas conjuntamente ou somente com wortmanina, composto capaz de inibir a via dependente de PI3-quinase, a qual, dentre outras funções, atua na polimerização do citoesqueleto de actina.

A figura 10 demonstra que a intensidade de fluorescência marcando a actina celular aumenta após tratamento com P21-His₆ (A e B), como já detectado em experimento anterior (retratado no item 4.8). Contudo, com o tratamento das células com wortmanina mais P21-His₆, a marcação para actina foi semelhante aos controles não tratados e tratados somente com wortmanina, indicando que o tratamento com wortmanina interferiu com a atividade de P21-His₆ sobre a reestruturação do citoesqueleto de actina (A, C e D).

Tais resultados indicam possivelmente que a atividade de P21 depende de PI3-quinase, sendo que o composto inibidor desta via também foi capaz de inibir a atuação de P21 no citoesqueleto celular.

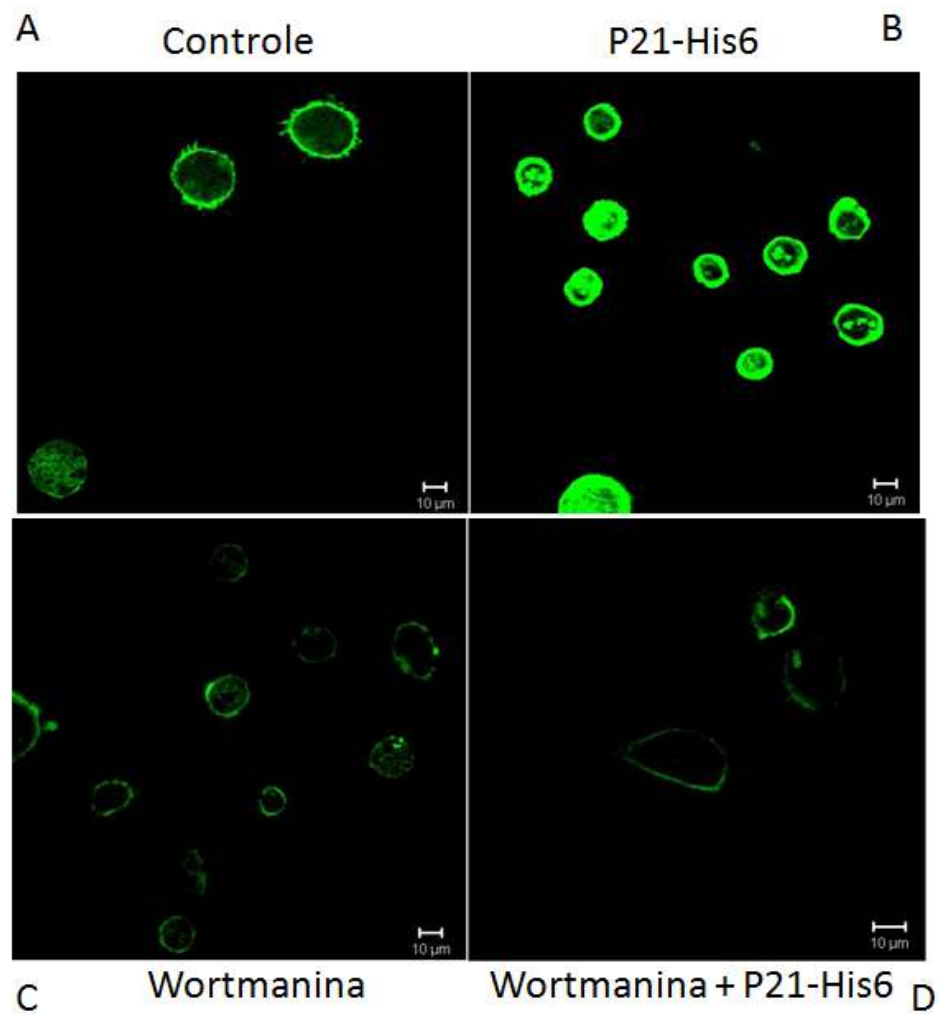


Figura 10: Ensaio de imunofluorescência para detecção da possível dependência da atividade de P21-His₆ na via de PI3-quinase. (A): controle de células sem tratamento com P21-His₆ ou wortmanina; (B): macrófagos + P21-His₆; (C): macrófagos + wortmanina; (D): macrófagos + P21-His₆ e wortmanina. P21-His₆ aumenta a polimerização da actina celular (B). A polimerização de actina induzida pela proteína recombinante foi inibida pelo tratamento das células com 1 μM de wortmanina (D). Marcação de filamentos de actina com faloidina-488.

6.0 DISCUSSÃO

6.1 Análise da diferença de infectividade de amastigotas extracelulares das cepas G e CL

6.1.1 Análise da diferença no perfil de infectividade de amastigotas extracelulares das cepas G e CL, comparando a infecção *in vitro* com *in vivo*

Em 1988, Andrews e colaboradores observaram a existência de formas amastigotas em meio extracelular, que determinaram sendo proveniente da diferenciação extracelular de tripomastigotas. Denominaram-nas, portanto, de amastigotas extracelulares. No mesmo ano, Ley e colaboradores determinaram que estas formas eram também infectivas, postulando-se um ciclo alternativo de *T. cruzi*, no qual amastigotas extracelulares eram também capazes de manter a infecção no hospedeiro vertebrado.

Buscando compreender melhor a atuação destas formas quanto a sua capacidade infectiva, comparamos neste trabalho a diferença de infectividade entre amastigotas extracelulares (AE) das cepas G (*T. cruzi* I) e CL (*T. cruzi* VI) *in vitro* e *in vivo*. Em experimentações *in vitro* anteriormente realizadas, observou-se que AE pertencentes à cepa G apresentaram uma alta infectividade quando comparadas aos amastigotas da cepa CL (MORTARA et al., 1999, SILVA et al., 2006), cujas formas tripomastigotas metacíclicas, do contrário, mostraram-se mais infectivas que as da cepa G (revisado em YOSHIDA, 2006). Corroborando tais dados, observamos no presente trabalho este maior perfil infectivo *in vitro* de amastigotas da cepa G em relação aos de CL, sendo que em ensaio de multiplicação realizado, foi identificado, tanto em células epiteliais tumorais (HeLa), quanto em fibroblastos embrionários de murinos, maior número de parasitos internalizados e multiplicados (após 24 e 48 horas da infecção) da cepa G em relação à CL.

Do contrário, observamos que camundongos BALB/c e C57BL/6, quando infectados com AE da cepa G, apresentaram ausência de parasitemia ao decorrer de 30 dias. Já camundongos infectados com a cepa CL apresentaram parasitemia significativa, indicando a fase aguda da doença. Da mesma forma, tripomastigotas metacíclicos da cepa G também não induzem parasitemia em modelos animais (revisado em YOSHIDA, 2006).

C. callosus, roedores da família Cricetidae, foram os únicos animais que apresentaram parasitemia para a cepa G, mesmo que sub-patente. Já aqueles infectados com a cepa CL apresentaram parasitemia patente. Provavelmente este cricetídeo tenha apresentado parasitemia para a cepa G devido ao fato de ser animal silvestre e esta cepa ser própria do ciclo silvestre de *T. cruzi*. Além disso, estudos anteriores demonstram que *C. callosus* é reservatório natural de *T. cruzi*, por apresentar parasitemia durante a infecção aguda, mas também ser capaz de controlá-la rapidamente, o que lhes oferece maior resistência à infecção que outros roedores, como ratos e camundongos (BORGES et al., 1992; ANDRADA et al., 1994, DOST et al., 2006).

Ao analisarmos todos os resultados acima, verificamos que AE da cepa G mostram-se mais infectivos que os da cepa CL somente em infecção *in vitro*. *In vivo* esta infectividade é significativamente menor, já que a cepa não é capaz de induzir parasitemia patente nos animais analisados. Reflexões sobre estes dados nos fazem questionar por que amastigotas extracelulares da cepa G que são altamente infectivos *in vitro*, não conseguem induzir uma infecção patente *in vivo*. Propusemos então que esta baixa infectividade *in vivo* não se deve ao momento inicial da interação do parasito com a célula hospedeira, ou seja, não é devido a ausência do reconhecimento do parasito pelo hospedeiro, já que amastigotas da cepa G são capazes de invadir as células *in vitro*, ainda mais significativamente que a cepa CL. Desta forma, provavelmente está

relacionada ao fato da cepa G mostrar-se mais susceptível a mecanismos de resposta imunológica do hospedeiro. Sendo assim, nosso próximo passo foi buscar compreender quais destes mecanismos imunológicos a cepa G mostra-se mais susceptível que a CL.

6.1.2 Análise da possível susceptibilidade da cepa G a atuação de macrófagos

A resposta imune inata do hospedeiro constitui-se de mecanismos diversos que buscam controlar a infecção tão prontamente o patógeno entra em circulação. Células fagocíticas, tais como macrófagos e células dendríticas, são as primeiras células a detectarem, por meio da fagocitose, microorganismos ou sinais de perigo existentes no hospedeiro (PAULNOCK, 1992; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

Em experimentos que realizamos *in vitro*, buscamos analisar se o fato de amastigotas extracelulares da cepa G não apresentarem parasitemia *in vivo* seria por consequência de sua alta suscetibilidade a atuação de macrófagos. Para isso, realizamos experimento *ex vivo* com macrófagos peritoneais inflamatórios. Os resultados obtidos demonstraram que a cepa G mostrou-se mais susceptível à atuação de tais células em relação à CL, havendo menor multiplicação desta cepa nos fagócitos.

A partir deste primeiro indício, tentamos refinar nossas análises buscando compreender a qual mecanismo exato os macrófagos estariam sendo submetidos e, assim, eliminando os parasitos. Como já se tem muito bem retratado na literatura, IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória cuja atuação na ativação de macrófagos mostra-se essencial para que estas células sejam capazes de eliminar patógenos intracelulares. Diversos estudos precedentes já demonstraram que tal citocina tem significativa importância na resposta a *T. cruzi*, sendo que animais IFN- $\gamma^{-/-}$, são extremamente susceptíveis a infecção, com alto índice de parasitemia e mortalidade (HOLSCER,

1998; MICHAILOWSKY et al., 2001; MARINHO et al., 2007). Assim, realizamos um experimento no qual nos utilizamos de macrófagos totalmente “*naive*”, ou seja, que não haviam entrado em contato com nenhum antígeno anteriormente, pois foram diferenciados *in vitro*. Tais macrófagos foram ou não estimulados com duas diferentes concentrações de IFN- γ (10 ou 100 ng/mL). Observamos que macrófagos estimulados com qualquer das concentrações da citocina foram capazes de eliminar parasitos da cepa G, sendo detectado um número significativamente menor de tripomastigotas liberados no sobrenadante em relação àquele proveniente de macrófagos não estimulados. Apesar da observada tendência na diminuição de parasitos da cepa CL após estimulação com a citocina, não observamos diferença estatisticamente significante entre os números de tripomastigotas liberados em macrófagos estimulados (tanto com 10 ou 100 ng/mL da citocina) em relação àqueles não estimulados. Contudo, tal resultado pode estar relacionado a baixa detecção de tripomastigotas da cepa CL em sobrenadante, mesmo em cultura de macrófagos não estimulados, provavelmente devido a sua menor infectividade *in vitro*.

Sendo assim, a partir dos resultados analisados acima, pode-se concluir que ambas as cepas, no entanto mais significativamente a cepa G, mostram-se susceptíveis a atuação de macrófagos, sendo a ativação destes por IFN- γ essencial para sua atividade perante tal infecção. Isso nos permite indicar que, possivelmente, a cepa G seja pouco infectiva *in vivo* devido a sua maior susceptibilidade a este mecanismo da resposta imune do hospedeiro.

Os resultados aqui encontrados mostram-se congruentes com achados de diversos laboratórios, que fornecem evidências de que componentes do sistema imune inato do hospedeiro desempenham um papel crucial no controle da replicação de *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção. Entre as citocinas, IFN- γ , produzida

principalmente por células NK e T, é a moléculas chave para controle desta infecção (REED, 1988). A atividade anti-parasitária de IFN- γ resulta de uma combinação de efeitos, os quais incluem a produção de óxido nítrico (NO) (GAZZINELLI, 1992), indução de MHC de classe II, polarização de células T para um perfil Th1, troca isotípica de imunoglobulinas, induzindo predomínio de IgG2a, e produção de quimiocinas (GAZZINELLI, 1992; CHESSLER et al., 2009). Sua atuação na ativação de macrófagos é principalmente devido a indução da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), a qual é responsável pela produção de óxido nítrico (NO) nestas células. Tal molécula mostra-se citotóxica ou citostática, sendo capaz de eliminar ou simplesmente inibir a replicação parasitária (GAZZINELLI, 1992; CHESSLER et al., 2009). IFN- γ também é capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênios (ROS) em macrófagos (TURRENS, 2004; ZACKS et al., 2005), através da ativação da enzima NADPH. ROS são extremamente tóxicas a patógenos intracelulares, assim como óxido nítrico, e em trabalho recente (GUIÑAZÚ et al., 2010) foi verificado que um antígeno de *T. cruzi*, cruzipaina, é capaz de induzir a produção de ROS em macrófagos, por meio da ativação de NADPH.

6.1.3 Análise *in vivo* dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro na infecção por amastigotas extracelulares das cepas G e CL

Uma vez identificado que AE da cepa G mostram-se altamente susceptíveis a atuação de macrófagos, devidamente ativados por IFN- γ , tentamos solucionar mais amplamente a quais outros mecanismos da resposta imune do hospedeiro a cepa G se mostraria mais susceptível que a CL.

Para isto infectamos com AE de ambas as cepas, camundongos selvagens e seus respectivos camundongos geneticamente deficientes para as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , Interleucina-12 (IL-12), para a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e

para MyD88. TNF- α possui função similar a de IFN- γ , a potencialização da ativação de macrófagos em sua atividade microbicida (BEUTLER; CERAMI, 1989). Interleucina-12 (IL-12) é produzida principalmente por macrófagos, sendo capaz de atuar em células “*Natural Killer*” (NK), resposta imune inata e linfócitos T, resposta adaptativa, induzindo-as a produzirem IFN- γ . Portanto, esta interleucina pode mediar a interconexão entre a resposta imune inata e adaptativa (MICALLEF et al., 1996, revisado em WATFORD et al., 2003). iNOS é principalmente induzida por IFN- γ , sendo responsável pela síntese de óxido nítrico, composto altamente tóxico que, muitas vezes, leva a eliminação de patógenos intracelulares (GAZZINELLI, 1992). MyD88 é a proteína adaptadora chave na sinalização intracelular mediada por receptores Toll-like (TLR), os quais estão presentes em todas as células do sistema imune inato e são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) (JANEWAY, 1998). Todos os TLR, exceto TLR-3, têm como proteína sinalizadora principal MyD88 (JANSSENS; BEYAERT, 2002), sendo que animais geneticamente deficientes para este componente são, conseqüentemente, deficientes na resposta induzida por esses receptores.

Os resultados obtidos mostraram que todos os camundongos geneticamente deficientes (para TNF- α , IL-12, iNOS e MyD88) infectados com a cepa CL apresentaram precocemente seu pico parasitemico e maior mortalidade que os selvagens. Desta forma, supomos que a cepa CL mostra-se suscetível a atuação de todos os mecanismos avaliados, já que na ausência destes os camundongos apresentaram maior parasitemia e mortalidade. Tais achados são similares aos de pesquisas anteriores. Abrahamsohn e Coffman (1996) observaram que camundongos infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* e que se submeteram ao tratamento com anticorpo anti-TNF- α , apresentaram significativo aumento no número de parasitos circulantes no sangue. Da

mesma forma, animais que receberam anticorpos monoclonais anti-IL-12 também apresentaram significativo aumento de parasitemia, indicando a importância destas citocinas no controle da infecção. Além disso, Michailowsky e colaboradores (2001) verificaram que animais deficientes para IL-12 e para iNOS, infectados com cepa colombiana de *T. cruzi* (*T. cruzi* I), são extremamente suscetíveis a infecção, apresentando alta parasitemia e 100% de mortalidade ao 20º dia pós-infecção. Ainda, em estudos realizados por dois distintos grupos de pesquisa (KOGA et al., 2006; BAFICA, 2006), observou-se a importante atuação de receptores “Toll-like” na infecção por *T. cruzi*, ao observarem altas parasitemias e conseqüente aumento de mortalidade em camundongos MyD88^{-/-} infectados com formas tripomastigotas da cepa Tulahuen (*T. cruzi* VI) e Y (*T. cruzi* II) de *T. cruzi*, respectivamente. Sendo assim, concluímos que amastigotas extracelulares da cepa CL mostram-se similarmente suscetíveis a mecanismos diversos da resposta imune do hospedeiro (atuação de TNF- α , IL-12, iNOS, MyD88) em relação a formas tripomastigotas pertencentes a outras cepas de *T. cruzi*. Além disso, podemos supor que esta cepa se mostre suscetível a mecanismos imunológicos diversos, pois provavelmente o hospedeiro não é capaz de eliminar prontamente estes amastigotas extracelulares e deve dispor-se de uma gama de mecanismos buscando atuar nesta infecção.

Contudo, dentre os animais infectados com a cepa G, somente os IL-12^{-/-} obtiveram parasitemia detectável, sendo esta momentânea (foi observada apenas ao 12º dia pós-infecção e rapidamente desapareceu). Sendo assim, esta cepa mostrou-se suscetível apenas a atuação da IL-12. A partir de tais resultados, buscamos focar nossas análises posteriores na cepa G. Desta forma, tentamos compreender o porque do rápido desaparecimento parasitemico desta cepa em IL-12^{-/-}. Pensamos que talvez a Interleucina-18 (IL-18) poderia estar compensando a ausência de IL-12 nos

camundongos deficientes em tal citocina, já que ambas possuem funções similares (OKAMURA et al., 1998). Ao tentarmos responder tal questionamento, infectamos camundongos IL-18^{-/-} somente com AE da cepa G. Infectamos, concomitantemente, animais IFN- γ ^{-/-} também somente com esta cepa, para reafirmar o indício anteriormente obtido (nos experimentos *in vitro*), de que esta citocina pró-inflamatória mostra-se crucial na suscetibilidade da cepa G.

Observamos, então, que somente os IFN- γ ^{-/-} apresentaram parasitemia patente e alta mortalidade, nos fazendo supor que IL-18 não seria essencial no controle da infecção pela cepa G, e muito provavelmente não é capaz de compensar a atuação de IL-12. Interessantemente, tal resultado foi semelhante ao encontrado por Graefe e colaboradores (2003), no qual somente camundongos IL-12p40^{-/-} (subunidade da citocina IL-12), infectados com tripomastigotas da cepa Tulahuen de *T. cruzi* (*T. cruzi* VI), apresentaram aumento de parasitemia e mortalidade em relação aos selvagens, contrariamente aos IL-18^{-/-}, que não diferiram em nenhum dos dois aspectos analisados aos animais selvagens. A maior suscetibilidade de animais IFN- γ ^{-/-} reafirma o resultado obtido anteriormente *in vitro*, de que esta citocina pró-inflamatória é de extrema importância no controle da infecção pela cepa G.

Todos os resultados discutidos acima nos fazem concluir que é provável que AE da cepa G sejam extremamente suscetíveis a atuação de macrófagos, a qual se mostra dependente da estimulação por IFN- γ . Tal conclusão provém do fato de que camundongos IFN- γ ^{-/-} e IL-12^{-/-} foram suscetíveis à infecção por esta cepa, sendo que IL-12 está diretamente associada à produção de IFN- γ , por induzir sua produção por células NK ou linfócitos T. A importância de IFN- γ em infecção por *T. cruzi* já é amplamente retratada por muitos outros pesquisadores, sendo que camundongos geneticamente deficientes para esta citocina ou para seu receptor, mostram-se altamente

suscetíveis a infecção por tripomastigotas, apresentando altos níveis de parasitemia e mortalidade (ABRAHAMSOHN, COFFMAN, 1996; HÖLSCHER et al., 1998; MARINHO et al., 2007). O desempenho de IL-12 também fora relatado previamente, sendo que já se observou a correlação existente entre altos níveis de IL-12 p40 e o aumento na atividade e citotoxicidade de células NK em secretar IFN- γ , durante infecção por tripomastigotas de *T. cruzi* (ANTÚNEZ, CARDONI, 2000).

Devido a momentânea parasitemia que os camundongos IL-12 $^{-/-}$ apresentaram, e pelo fato desta ocorrer ao 12º dia pós-infecção (mais inicialmente a infecção), acreditamos ser possível que a principal fonte desta interleucina sejam as células NK. Estudos anteriores (LIEKE et al., 2004; CARDILLO et al., 2004; revisado por CHESSLER et al., 2009) demonstraram que a depleção de células NK inibe a primeira onda na produção de IFN- γ em esplenócitos isolados de camundongos infectados com *T. cruzi*, indicando que tais células são responsáveis pelo início da produção desta citocina pró-inflamatória. Adicionalmente, a ausência de NK resultou em aumento da susceptibilidade de camundongos à infecção por *T. cruzi*, demonstrando a importância dessa resposta inata no controle da infecção.

Camundongos iNOS $^{-/-}$ não apresentaram parasitemia para a cepa G, possibilitando-nos prever que o principal mecanismo de eliminação dos amastigotas intracelulares pelos macrófagos não seja, provavelmente, pela produção de óxido nítrico, mas talvez pela ação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Portanto, a enzima que estaria possivelmente atuando nesta produção seria NADPH (GUIÑAZÚ, 2010). Este resultado mostra-se contraditório com os observados por diversos grupos de pesquisa, que afirmam ser óxido nítrico o principal composto com ação tripanocida (HÖLSCHER et al., 1998; NATHAN; SHILOH, 2000; COLASANTI et al., 2002; SILVA et al., 2003; BERGERON; GUTIERREZ et al., 2009).

Camundongos MyD88^{-/-} não apresentaram parasitemia para a cepa G, indicando possivelmente que a atuação de TLR não mostra-se o mecanismo principal de reconhecimento deste parasito pelo sistema imune inato, ou ainda que talvez haja a atuação destes contudo existam outros possíveis mecanismos que estejam atuando quando da ausência de tais receptores. A não suscetibilidade da cepa G a TNF- α pode ser explicada pela similaridade de sua função com a de IFN- γ , a qual estaria possivelmente atuando preferencialmente na resposta imune contra a cepa G.

A partir de todos os resultados obtidos, acreditamos que a cepa G mostra-se altamente suscetível a um dos mecanismos mais primários da resposta imune, a atuação de macrófagos. Sendo assim, o hospedeiro parece ser capaz de controlar prontamente a infecção com este primeiro mecanismo, não necessitando dispor de outros mecanismos da resposta imune inata ou adaptativa. Consequentemente, podemos inferir que, muito provavelmente, AE da cepa G não induzem parasitemia patente *in vivo* devido a sua alta suscetibilidade a atuação de macrófagos ativados por IFN- γ .

Nossos resultados e análises realizadas para a resposta imune à infecção pela cepa G são extremamente similares aos obtidos em estudos com outra cepa pertencente ao grupo *T. cruzi* I, Sylvio X10/4 (MARINHO et al., 2007; revisado em MARINHO et al., 2009). Tais estudos demonstram que camundongos infectados com esta cepa não induzem parasitemia patente, sendo raramente visualizados tripomastigotas na circulação dos animais. Essa parasitemia subpatente parcialmente resulta da susceptibilidade dos parasitos da cepa Sylvio X10/40 a mecanismos efetores induzidos por IFN- γ , já que em animais deficientes para esta citocina, podem ser facilmente encontrados tripomastigotas em esfregaços sanguíneos, duas e quatro semanas após infecção (MARINHO et al., 2006; revisado em MARINHO et al., 2009). Camundongos com ausência de IL-12p40 e iNOS mostram-se mais resistentes à infecção que os IFN- γ

/, sendo que raramente apresentam parasitemia. No entanto, camundongos IL-12p40^{-/-} ainda apresentam alguma suscetibilidade, pois tem maior mortalidade que camundongos selvagens.

Sendo assim, podemos propor que cepas pertencentes ao grupo *T. cruzi* I podem ter similaridades quanto à infectividade *in vivo* e quanto a suscetibilidade aos mecanismos da resposta imune do hospedeiro.

6.1.4 Análise da possível ativação da infecção por amastigotas extracelulares da cepa G em animais imunossuprimidos

Buscando observar se em processo de imunossupressão, poderia haver a ativação da infecção pela cepa G em camundongos, infectamos camundongos C57BL/6 com amastigotas extracelulares das cepa G ou CL, e os imunossuprimimos com Decadron® (dexametasona) 10 dias após. Um grupo de animais não foi imunossuprimido como controle.

Os resultados obtidos demonstram que camundongos imunossuprimidos e infectados com a cepa CL apresentaram precocemente seu pico de parasitemia, por volta do 18º dia pós-infecção (p.i.), apresentando, conseqüentemente, maior índice parasitário em relação aos camundongos não imunossuprimidos. Em decorrência desta precoce parasitemia, a mortalidade de tais animais foi também precoce, iniciando no 20º dia p.i, sendo que no 25º dia todos encontravam-se mortos. Camundongos infectados com a cepa G e que foram imunossuprimidos também apresentaram parasitemia significativa, contrastando com a ausência de parasitemia apresentada pelos não imunossuprimidos. Conseqüentemente, a mortalidade destes primeiros animais foi maior que aquela apresentada pelos não tratados.

Estas observações indicam que a cepa G, mesmo não apresentando parasitemia patente em camundongos, possivelmente devido a sua alta suscetibilidade a atuação de macrófagos ativados por IFN- γ , não é completamente eliminada pelos mecanismos da resposta imune do hospedeiro. O parasito provavelmente permanece como em estado de dormência e, uma vez havendo a imunossupressão do animal, há a ativação do parasito, o qual é capaz de induzir parasitemia patente. Tal resultado também reafirma os resultados obtidos anteriormente, tanto em análises *in vitro* quanto *in vivo*, que predizem que amastigotas extracelulares da cepa G não induzem parasitemia *in vivo* tão somente devido a atuação do sistema imune do hospedeiro, já que quando este sistema torna-se comprometido, em situação de imunossupressão, há ativação e detecção de parasitos na circulação sanguínea dos animais.

Com este experimento, buscamos demonstrar a importância da infecção por cepas de *T. cruzi* consideradas de baixa infectividade. A maior parte dos estudos relacionados a resposta imune do hospedeiro ao parasito são provenientes de modelos experimentais infectados com tripomastigotas derivados de cultura de tecidos de cepas consideradas de alta infectividade (pertencentes aos grupos *T. cruzi* II ao VI). Escassos são os existentes acerca de cepas pertencentes ao grupo *T. cruzi* I, consideradas de baixa infectividade (HOFT; EICKHOFF, 2005; TARLETON, 2007; PADILLA; BUSTAMANTE; TARLETON, 2009).

Na região sul da América do Sul, as populações de *T. cruzi* II, V e VI parecem estar associadas com a doença de Chagas e *T. cruzi* I com ciclos silvestres do parasito. No entanto, em pesquisa realizada recentemente (BURGOS et al., 2010), observou-se que amostras de sangue e de tecido cardíaco proveniente de pacientes chagásicos, que deveriam submeter-se a transplantação cardíaca, apresentaram infecção por cepas de *T. cruzi* I, além de casos de co-infecção com cepas de distintos grupos. Também já

relatados casos de pacientes que tiveram reativação de infecção por cepas pertencentes a *T. cruzi* I (BURGOS et al., 2010). Tais fatos ressaltam a importância de maiores estudos a cerca destas cepas.

6.2 Análise do Possível Potencial Pró-fagocítico de P21-His₆

6.2.1 Análise da indução inespecífica de fagocitose induzida por P21-His₆

Durante trabalho recente, Silva et al (2009) caracterizaram, a partir de triagem em base de dados do genoma de *Trypanosoma cruzi*, uma proteína ubíquota ao parasito de peso molecular 21 kDa denominada, portanto, de P21. Observou-se, neste estudo, que em ensaios de invasão celular *in vitro* realizados com tripomastigotas e amastigotas extracelulares das cepas G e CL em células HeLa quando incubadas conjuntamente com a proteína recombinante, P21-His₆, as células apresentaram maior número de parasitos internalizados. Foi proposto, portanto, que a proteína poderia estar envolvida com o processo de internalização parasitária, e que as células, ao serem expostas à tal proteína, promoveriam eventos de sinalização cruciais para a invasão do protozoário.

Além disso, durante ensaios preliminares realizados pelo Dr^o Claudio Vieira da Silva, em seu pós-doutorado na UNIFESP (2007), observou-se a atuação P21-His₆ no processo de invasão de bactérias *Escherichia coli* enteroinvasivas (EIEC), sendo verificada maior porcentagem de células HeLa infectadas quando tratadas com a proteína (dados não publicados). Desta forma, foi suposto que P21-His₆ poderia ser ativadora inespecífica de fagocitose, não estando seu efeito restrito somente a *Trypanosoma cruzi*.

No presente trabalho, buscamos observar justamente este possível efeito inespecífico de P21-His₆ na indução de fagocitose. Para tanto realizamos ensaios de

invasão no qual macrófagos peritoneais de *C. callosus* foram incubados com AE da cepa G ou CL, com taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, ou ainda com promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Durante esta incubação, algumas das células foram tratadas conjuntamente com solução contendo 40 µg/mL da proteína recombinante.

Verificamos que o tratamento com a proteína recombinante baseada na P21 de *T. cruzi* no momento da infecção parasitária aumentou tanto a invasão de *T. cruzi*, o parasito que ubiquamente expressa, quanto de *L. amazonensis* e de *T. gondii*, que não a expressam. Este fato indica que P21-His₆ não tem sua ação específica a *T. cruzi*, mesmo sendo proteína exclusiva de tal parasito, mas é capaz de atuar na invasão de patógenos diversos.

Com o intuito de confirmarmos os indícios relatados acima, realizamos ensaios de invasão nos quais macrófagos de *C. callosus* foram incubados com partículas de zimozan, e tratados ou não com P21-His₆. Notamos que após todos os tempos de tratamento com a proteína recombinante (uma hora, 3, 6, 12, 24 e 48 horas), houve aumento significativo na fagocitose de zimozan, quando comparado com macrófagos não tratados. Tal fato nos certifica que esta proteína recombinante realmente induz o processo fagocítico independentemente da característica do agente a ser fagocitado, ou seja, inespecificamente.

6.2.2 Análise da atuação de P21-His₆ no citoesqueleto de actina celular

Após as observações anteriores, do efeito de P21-His₆ na invasão de patógenos, assim como na indução de fagocitose de partículas de zimozan, buscamos compreender como se daria a atuação desta proteína. Como ela estaria atuando na célula hospedeira promovendo o processo fagocítico. Como já é bem compreendido, o citoesqueleto de actina celular tem papel fundamental durante processo fagocítico e invasão de

patógenos (CASTELLANO; CHAVRIER; CARON, 2001). A polimerização de actina é a consequência final de uma complexa cascata de sinais de transdução provindos da ligação do antígeno a receptores presentes na superfície da célula hospedeira. Muitos são os sinalizadores intracelulares que mediam a ligação entre o reconhecimento do elemento a ser fagocitado e o consequente rearranjo do citoesqueleto, induzindo a formação de expansões da membrana celular e culminando em sua fagocitose. Sabe-se que proteínas que mostram-se cruciais neste processo são da família das Rho GTPases (CASTELLANO; CHAVRIER; CARON, 2001; revisado em GAD; ASPENSTRÖM, 2010).

Considerando-se esta atuação central da dinâmica do citoesqueleto de actina no processo de fagocitose, diferentes patógenos desenvolveram mecanismos de virulência que os permitem interferir na dinâmica do citoesqueleto de actina da célula hospedeira, induzindo sua internalização (CASTELLANO; CHAVRIER; CARON, 2001; NIEDERGANG; CHAVRIER, 2004). Um exemplo são bactérias enteropatogênicas *Listeria* e *Yersinia*, as quais ligam-se a proteínas de adesão da célula hospedeira induzindo a polimerização de actina e, conseqüentemente, sua entrada na célula. Por outro lado, *Shigella* e *Salmonella* secretam proteínas que promovem a ativação de vias de sinalização intracelulares culminando com o remodelamento do citoesqueleto e sua internalização na célula. Proteínas SopE e SopE2 secretadas por *Salmonella*, por exemplo, promovem a ativação de GTPases, uma das principais proteínas que atuam na reestruturação do citoesqueleto (CASTELLANO; CHAVRIER; CARON, 2001).

Protozoários também mostram-se dependentes da atuação do citoesqueleto celular durante sua invasão nas células hospedeiras. Em pesquisa realizada por Silva et al. (2009), observou-se que o tratamento de células com citocalasina D e latrunculina B (compostos que desestruturam o arranjo do citoesqueleto de actina) inibiu a invasão de

taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, sugerindo a importância da integridade do citoesqueleto de actina durante o processo de invasão destes. Formas amastigotas extracelulares de *T. cruzi* induzem a agregação de filamentos de actina no sítio de adesão à célula hospedeira, formando estruturas semelhantes a taças as quais levam a internalização do parasito. Sendo assim, tais formas também dependem da integridade do citoesqueleto de actina para obterem sucesso na invasão celular (MORTARA, 1991; PROCÓPIO et al., 1998).

A partir destes embasamentos, com o intuito de verificar se a proteína P21-His₆ estaria induzindo inespecificamente a fagocitose e invasão parasitária por sua atuação no arranjo do citoesqueleto de actina, realizamos experimento no qual macrófagos peritoneais de *C. callosus* foram tratados ou não com 40 µg/ml da proteína recombinante, por 24 ou 48 horas e a actina celular foi marcada com faloidina-488.

Observamos o aumento de marcação fluorescente em macrófagos tratados com a proteína, em relação aqueles não tratados. A visualização deste aumento da fluorescência nos dá indícios de que houve a polimerização e o rearranjo da actina na célula, resultando em sua concentração na região cortical. Portanto os indicativos são de que P21-His₆ foi capaz de atuar no citoesqueleto de actina e, muito provavelmente, é através desta atuação que a proteína induz a internalização ou fagocitose de patógenos de forma inespecífica.

6.2.3 Análise da possível interação de P21-His₆ com a via de sinalização de PI3-quinase

Ao verificarmos anteriormente a provável atuação de P21-His₆ no citoesqueleto de actina celular, buscamos compreender qual a possível via de sinalização intracelular que esta proteína estaria induzindo e que culminaria com o rearranjo do citoesqueleto na

célula hospedeira. Nossa hipótese foi a de que talvez esta via envolvesse a proteína PI3-quinase, a qual, dentre outras funções, tem atuação no rearranjo do citoesqueleto de actina (JANMEY et al., 1992). Buscando verificar tal hipótese, tratamos macrófagos peritoneais de *C. callosus* com P21-His₆, e alguns deles tratamos conjuntamente ou somente com wortmanina, composto capaz de inibir a via dependente de PI3-quinase. A actina da célula foi visualizada através de marcação com faloidina-488.

Os resultados demonstram que a intensidade de fluorescência marcando a actina celular aumentou após tratamento com P21-His₆, como já detectado em experimento anterior. Contudo, com o tratamento das células com wortmanina, houve diminuição significativa na intensidade de fluorescência. Isto provavelmente ocorreu devido a inibição da atuação de PI3-quinase pelo tratamento. Já existe o conhecimento de que esta enzima atua indiretamente no citoesqueleto de actina, sendo capaz de fosforilar fosfolípidios de membrana, tais como fosfatidilinositol-4-fosfato (PI[4]P) ou fosfatidilinositol bifosfato (PI[4,5] bifosfato) gerando, respectivamente, fosfatidil inositol-3,4-bifosfato (PI[3,4] bifosfato) ou fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PI [3,4,5]trifosfato), os quais interagem com proteínas associadas ao citoesqueleto de actina, como profilina e gelsolina (SILVA et al, 2009). Gelsolina é capaz de se ligar a actina e desempenhar a regulação da agregação ou desagregação de seus filamentos, por meio da indução do aumento de Cálcio (JANMEY et al., 1992). Profilina, ao ligar-se na actina, inibe sua polimerização. Os fosfoinosítídeos são capazes de dissociar o complexo actina-profilina, permitindo o recrutamento de actina à membrana plasmática, promovendo localmente sua polimerização (WITKE et al., 1998). Portanto, ao se inibir a atuação de PI3-quinase com wortmanina, interfere-se consequentemente na estrutura do citoesqueleto de actina induzindo sua não polimerização.

Como último resultado obtivemos que quando as células foram tratadas conjuntamente com wortmanina e P21-His₆, observamos o mesmo padrão de fluorescência apresentado pelas células tratadas somente com wortmanin. Tal evidência é um indício da possível dependência da atividade de P21-His₆ com a via envolvendo PI3-quinase, uma vez que na ausência de sua atividade quinásica não percebemos a atuação da P21-His₆ na polimerização da actina cortical, esta proteína ubíquota de *T. cruzi* não fora capaz de restaurar a polimerização de actina quando na presença de wortmanina.

Acreditamos, portanto, ser possível que a proteína P21-His₆ tem sua atuação dependente da via de PI3-quinase sendo que, uma vez ativando tal enzima, há a fosforilação de fosfolipídios os quais atuam em proteínas associadas a actina, promovendo sua polimerização local nas células.

7.0 CONCLUSÕES

- Amastigotas extracelulares da cepa G apresentaram maior capacidade infectiva que aqueles pertencentes à cepa CL, em experimentações *in vitro*. No entanto, apresentaram baixa infectividade *in vivo* em relação à cepa CL;
- Amastigotas extracelulares da cepa G mostraram-se suscetíveis à atuação de macrófagos, em análises *in vitro*, e à atuação de IL-12 e IFN- γ , em análises *in vivo*. Já amastigotas extracelulares da cepa CL mostraram-se menos suscetíveis aos macrófagos do que a cepa G, mas apresentaram suscetibilidade a todos os mecanismos analisados *in vivo* para esta cepa, sendo estes TNF- α , iNOS, IL-12 e MyD88;
- Animais imunossuprimidos apresentaram ativação da infecção por amastigotas extracelulares das cepas G;
- P21-His₆ apresentou potencial pró-fagocítico inespecífico;
- P21-His₆ apresenta potencial pró-fagocítico possivelmente devido a sua capacidade de ativar PI3-quinase.

8.0 PERSPECTIVAS FUTURAS

A realização deste estudo possibilitou levantarmos uma série de questionamentos que pretendemos ou já estamos tentando respondê-los. Neste contexto, pretendemos realizar análises histológicas dos camundongos selvagens e geneticamente deficientes infectados com amastigotas extracelulares das cepas G e CL, para uma análise mais detalhada do perfil inflamatório em diferentes órgãos, tais como coração, fígado e baço. Durante meus experimentos já foram coletados estes órgãos e as lâminas de cortes histológicos feitas. Portanto a análise será prontamente realizada. Também pretendemos realizar um estudo mais aprofundado sobre o uso de *C. callosus* como modelo da infecção experimental por *T. cruzi*. Verificamos que foi neste animal que conseguimos observar parasitemia, mesmo que sub-patente, para a infecção com amastigotas extracelulares da Cepa G. A Dra. Noemi Taniwaki também fez esta observação quando infectou o animal com formas tripomastigotas de cultura de tecido (Comunicação pessoal). Em seu trabalho com colaboração de nosso grupo que está em processo de publicação, a Dra. Noemi verificou que *C. callosus* infectados com tripomastigotas das cepas G, CL e Y somente apresentaram reativação da doença quando imunossuprimidos 6 meses ou 1 ano após a infecção inicial, aqueles infectados com as cepas CL e Y. Estes dados sugerem que o animal conseguiu curar da infecção pela cepa G. De fato, nós também verificamos que o tempo de parasitemia na fase aguda é bastante curto tanto para cepa G quanto para cepa CL. De posse destes dados nos questionamos: Quais os mecanismos ativados por *C. callosus*, uma espécie de roedor silvestre, que promove a cura da doença experimental causada por parasitas da cepa G, mas não por aqueles das cepas CL e Y? Como seria o comportamento da infecção causada por outras cepas pertencentes ao grupo *T. cruzi* I e *T. cruzi* II a VI?

Como não há no mercado reagentes espécie-específicos para os estudos empregando este modelo, pretendemos realizar estudos de proteômica, tentando assim identificar por espectrometria de massas componentes presentes no soro, em sobrenadantes de células de baço de animais infectados ao longo de um ano de infecção bem como após imunossupressão. Avaliaremos também componentes secretados por linfócitos e macrófagos de *C. callosus* ativados pelo parasita *in vitro*. Faremos também análises histológicas para verificação de ninhos de amastigotas das diferentes cepas, bem como detecção de DNA de células presentes no sangue circulante, baço, fígado, cérebro de animais infectados empregando diferentes iniciadores como critério de cura da doença experimental.

Quanto aos dados relacionados a atividade pró-fagocítica induzida pela forma recombinante da P21, pretendemos confirmar o envolvimento da PI 3-quinase no processo de sinalização, realizando ensaios de imunoblotting marcando para Akt fosforilada e não fosforilada. Pretendemos realizar microscopia eletrônica de transmissão para avaliarmos a cinética do fagossomo contendo zimozan e P21-His₆, bem como pretendemos realizar microscopia de varredura para avaliarmos o efeito da proteína sobre as projeções membranas de células tratadas em comparação com células não tratadas. Estamos realizando experimentos para tentarmos identificar o receptor da P21-His₆ em macrófagos e estamos apostando na possibilidade de que receptores serpentiniformes acoplados a proteína G (receptores de quimiocinas) sejam ligantes para a nossa proteína recombinante. Realizamos experimentos preliminares empregando SDF-1 alfa, uma quimiocina que se liga ao receptor CXCR4. Em nosso modelo experimental nós plaqueamos os macrófagos de camundongos C57BL/6 e tratamos com SDF-1 alfa trinta minutos antes de adicionarmos a proteína e partículas de zimozan, tratamos com SDF-1 alfa e P21-His₆ ao mesmo tempo em que adicionamos as

partículas de zimozan e tratamos apenas com a P21-His₆. Nossos dados sugerem que o receptor CXCR4 tem grande potencial para ser o receptor da proteína recombinante da P21, pois nas situações tratadas com SDF-1 alfa trinta minutos antes e junto com a P21-His₆ a taxa de invasão foi semelhante ao controle não tratado, ao passo que o tratamento somente com a P21-His₆ aumentou a internalização de zimozan quando comparado ao controle. Pretendemos estender estes experimentos empregando o inibidor específico do receptor CXCR4 (AMD3100), bem como realizaremos ensaios de co-imunoprecipitação e ensaio de competição de adesão celular para este e provavelmente outros receptores de quimiocina. Caso esta estratégia funcione, um cenário de novas possibilidades se abre no sentido de estudarmos se nossa proteína recombinante funcionaria como agonista da quimiocina SDF-1 alfa (CXCL12).

A realização deste trabalho nos levou também a tentar entender como seria o processo de controle da infecção pelo hospedeiro vertebrado. Na ausência de tratamento a parasitemia em modelos murinos desaparece após 30 dias de infecção, contudo se os animais são imunossuprimidos os parasitas reaparecem na circulação da maioria dos animais infectados. Neste contexto, componentes oriundos do parasita podem ser produzidos por amastigotas intracelulares com o objetivo de bloquear sua multiplicação e viver em um ambiente livre da atuação do sistema imunológico do hospedeiro, bem como componentes produzidos pelo hospedeiro possam também exercer tal função. Acreditamos que a polimerização do citoesqueleto de actina possa fornecer uma barreira física impedindo a multiplicação dos amastigotas e assim sua diferenciação em tripomastigotas e liberação para a circulação. Sob o ponto de vista do parasita a proteína P21 pode ter sua expressão regulada durante o desenvolvimento intracelular e ser mais expressa logo após a fase aguda para promover polimerização da actina cortical da célula infectada e assim dificultar sua própria multiplicação. Em resultados obtidos no

trabalho de Iniciação Científica da aluna Lilian Cruz, foi visto que *in vitro* componentes reguladores da dinâmica de actina são essenciais durante a multiplicação dos amastigotas. Células Anexina A2^{-/-}, N-WASP^{-/-} e Galectina-3^{-/-} são altamente permissivas à multiplicação em comparação às células selvagens. Desta forma, pretendemos durante o doutoramento avaliar a importância da dinâmica do citoesqueleto de actina para o estabelecimento da fase crônica da infecção experimental por *T. cruzi*.

9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Experimental Parasitology**, v. 84, p. 231–244, 1996.

ALIBERTI, J. C.; MACHADO, F. S.; SOUTO, J. T.; CAMPANELLI, A. P.; TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. β -Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 4819-4826, 1999.

ALIBERTI, J. C.; CARDOSO M. A.; MARTINS, G. A.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, J. S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 1961-7, 1996.

ALVES, M. J. M.; ABUIN, G.; KUWAJIMA, V. Y.; COLLI, W. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 21, p. 75–82, 1986.

ANDRADA, S. G.; KLOETZEL, J. K.; BORGES, M. M.; FERRANS, V. J. Morphological aspects of myocarditis and myositis in *Calomys callosus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*: fibrogenesis and spontaneous regression of fibrosis. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 379–1393, 1994.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, p. 1135-1143, 2004.

ANDREOLI, W. K.; MORTARA, R.A. Acidification modulates the traffic of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes in Vero cells harboring *Coxiella burnetti* vacuoles. **International Journal of Parasitology**, v. 33, p. 185-197, 2003.

ANDREWS, N. W.; ABRAMS, C. K.; SLATIN, S. L.; GRIFFITHS, G. A. *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, v. 61, p. 1277-1287, 1990.

ANDREWS, N. W.; HONG, K. S.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 64, p. 474-484, 1987.

ANDREWS, N. W.; ROBBINS, E. S.; LEY, V.; HONG, K. S.; NUSSENZWEIG, V. Developmentally regulated, phospholipase C-mediated release of the major surface glycoprotein of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, p. 300-314, 1988.

ANDREWS, N. W.; WHITLOW, M. B. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, p. 249-256, 1989.

AÑEZ, N.; CRISANTE, G.; DA SILVA, F. M.; ROJAS, A.; CARRASCO, H.; UMEZAWA, E. S.; STOLF, A. M.; RAMÍREZ, J. L.; TEIXEIRA, M. M. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. **Tropical Medicine and International Health**, v. 9, p. 1319-1326, 2004.

ANTÚNEZ, M. I.; CARDONI, R. L. IL-12 and IFN- γ production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Immunology Letters**, v. 71, p. 103-109, 2001.

AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHI, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L. E. Jr.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M. A. 9,000-year Record of Chagas's disease. **PNAS**, v. 101, p. 2034-2039, 2004.

AUGUSTINE, S. A. J.; KIESHCENKO, Y. Y.; NDE, P. N.; PRATAP, S.; AGER, E.A.; BURNS-JR, J. M.; LIMA, M. F.; VILLALTA, F. Molecular cloning of a *Trypanosoma cruzi* cell surface casein kinase II substrate, Tc1, involved in cellular infection. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 3922–3929, 2006.

BAFICA, A.; SANTIAGO, H. C.; GOLDSZMID, R.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R.T. Cutting edge: TLR-9 and TLR-2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 3515–3519, 2006.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, p. 245–252, 1998.

BARRETO, M. P. - Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, p. 89 – 151, 1979.

BEACHEY, E. H. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. **Journal of Infectious Disease**, v. 143, p. 325-345, 1981.

BEUTLER, B; CERAMI, A. The biology of cachectin/TNF: a primary mediator of the host response. **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 625, 1989.

BORGES, M. M.; ANDRADE, S. G.; PILLATI, C. G.; PRADO, J. R. J. C.; KLOETZEL, J. K. Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus* and Swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 493–502, 1992.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 114, n. 2, p. 103–110, 1997.

BRENER, Z. A descoberta (Homenagem aos 80 anos da descoberta da doença de Chagas). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 1-6, 1989.

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

BRIONES, M. R. S.; SOUTO, R. P.; STOLF, B. S.; ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 104, p. 219-232, 1999.

BRISSE, S.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **International Journal Parasitology**, v. 30, p. 35–44, 2000a.

BRISSE, S.; DUJARDIN, J.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequenced-characterised amplified region markers. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 111, p. 95–105, 2000b.

BRODSKYN, C. I.; SILVA, A. M.; TAKEHARA, H. A.; MOTA, I. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Immunology and Cell Biology**, v. 67, p. 343–348, 1989.

BRYAN, M. A.; GUYACH, S. E.; NORRIS, K. A. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. **Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p 733, 2010.

BURGOS, J. M.; DIEZ, M.; VIGLIANO, C.; BISIO, M.; RISSO, M.; DUFFY, T.; CURA, C.; BRUSSES, B.; FAVALORO, L.; LEGUIZAMON, M. S.; LUCERO, R. H.; LAGUENS, R.; LEVIN, M. J.; FAVALORO, R.; SCHIJMAN, A. G. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, p 485-95, 2010.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N.W. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Current Opinion in Microbiology**, v.1, p. 461–465, 1998.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca^{2+} -signaling factor for mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 5172–5180, 1995a.

BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cellular Microbiology**, v. 4, p.701-711, 2002.

BLACK, C. L.; OCAÑA, S.; RINER, D. Household risk factors for *Trypanosoma cruzi* seropositivity in two geographic regions of Ecuador. **Journal of Parasitology**, v. 93, p. 12–16, 2007.

CALER, E. V.; VAENA DE AVALOS, S.; HAYNES, P. A.; ANDREWS, N. W.; BURLEIGH, B. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **EMBO Journal**, v. 17, p. 4975-4986, 1998.

CAMPOS, M. A.; ALMEIDA, I. C.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; VALENTE, E. P.; PROCOPIO, D. O.; TRAVASSOS, L. R.; SMITH, J. A.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Activation of Toll-like receptor-2 by lysosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **Journal of Immunology**, v. 167, p. 416-423, 2001.

CARDILLO, F.; NOMIZO, A.; POSTOL, E.; MENGEL, J. NK1.1 cells are required to control T cell hyperactivity during *Trypanosoma cruzi* infection. **Medical Science**

Monitor, v. 10, p. 259–267, 2004.

CASTELLANO, F.; CHAVRIER, P.; CARON, E. Actin dynamics during phagocytosis. **Seminars in immunology**, v. 13, p. 347-355, 2001.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum* n. gen, n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159–218, 1909.

CHESSLER, A. C.; UNNIKRISHNAN, M.; BEI, A. K.; DAILY, J. P.; BURLEIGH, B. A. *Trypanosoma cruzi* triggers an early type I IFN response *in vivo* at the site of intradermal infection. **The Journal of Immunology**, v. 182, p. 2288–2296, 2009.

CORTEZ, M.; NEIRA, I.; FERREIRA, D.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; ATAYDE, V. D.; YOSHIDA, N. Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. **Infection and Immunity**, v. 71 p. 6184-6191, 2003.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V.; FERNANDES, O.; VALENTE, S. A. S.; MILES, M. A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 18, p.171–176, 2002.

DE SOUZA, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 86, p.197-283, 1984.

DE SOUZA, W. Chagas disease: fact and reality. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 544–545, 2007.

DELANOË, P.; DELANOË, M. A propos du *Schizotrypanum cruzi*. **Bulletion of the Exotic Pathology Society**, v. 5, p. 599–602, 1912.

DINOIA, J. M.; BUSCAGLIA, C. A De MARCHI, C. R.; ALMEIDA, I. C.; RASCH, A. C. C. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, p. 401–413, 2002.

DIAS, J. C. P. Control of Chagas disease in Brazil. **Parasitology Today**, v. 3, p. 336–341, 1987.

DIAS, J. C. P. Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine (WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M.E., RASSI, A. Eds.) ISBT, São Paulo, p.49 – 80,1992.

DOS REIS. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Today**, v. 13, p. 335–342, 1997.

DOS SANTOS, D. M.; TALVANI, A.; GUEDES, P. M.; MACHADO-COELHO, G. L.; DE LANA, M.; BAHIA, M. T. *Trypanosoma cruzi*: Genetic diversity influences the profile of immunoglobulins during experimental infection. **Experimental Parasitology**, v. 121, p. 8-14, 2009.

DOST, C. K.; SARAIVA, J.; ZENTGRAF, U.; MONESI, N.; ENGELS, W.; ALBUQUERQUE, S. Is nitric oxide involved in the tolerance of *Calomys callosus* as a reservoir host towards *Trypanosoma cruzi* infection? **Journal of Infection**, v. 52, p. 49–55, 2006.

ESPINOZA, B.; RICO, T.; SOSA, S.; OAXACA, E.; VIZCAINO-CASTILLO, A.; CABALLERO M. L.; MARTÍNEZ, I. Mexican *Trypanosoma cruzi* T. cruzi I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-10, 2009.

FERNANDES, A. B.; MORTARA, R. A. Invasion of MDCK epithelial cells with altered expression of Rho GTPases by *Trypanosoma cruzi* amastigotes and metacyclic trypomastigotes of strains from the two major phylogenetic lineages. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 460-467, 2004.

FERNANDES, A. B.; NIEIRA, I.; FERREIRA, A.T.; MORTARA, R. A. Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. **Parasitology Research**, v. 100, p. 59–68, 2006.

FERNANDES, M. C.; CORTEZ, M.; YONEYAMA, K. A. G.; STRAUS, A. H.; YOSHIDA, N.; MORTARA, R. A. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: Implication of cholesterol and host cell microdomains. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1431-1441, 2007.

FERNANDES, O.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; PINHO, A. P.; MOREL, C. M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; JANSEN, A. M. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. **Parasitology**, v. 118, p. 161–166, 1999.

GAD, A. K. B.; ASPENSTRÖM, P. R. If proteins take to the RhoD: Rho GTPases at the crossroads of actin dynamics and membrane trafficking. **Cellular Signalling**, v. 22, p. 183–189, 2010.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HEINY, S.; JAMES, S. L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . **European Journal of Immunology**, v. 22, p. 2501-2506, 1992.

GIORDANO, R.; CHAMMAS, R.; VEIGA, S. S.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M. An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 65, p. 85–94, 1994.

GIORDANO, R.; FOUTS, D. L.; TEWARI, D.; COLLI, W.; MANNING, J. E.; ALVES, M. J. M. Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 3461–3468, 1999.

GRAEFE, S. E. B.; JACOBS, T.; GAWORSKI, I.; KLAUENBERG, U.; STEEG, C.; FLEISCHER, B. Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to *Trypanosoma cruzi* in mice. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 833–839, 2003.

GRELLIER, P.; VENDEVILLE, S.; JOYEAU, R.; BASTOS, I. M. D.; DROBECQ, H.; FRAPPIER, F.; TEIXEIRA, A. R. L.; SCHRÉVEL, J.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SERGHERAERT, C.; SANTANA, J. M. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc 80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 47078–47086, 2001.

GUIÑAZU, N.; CARRERA-SILVA, E. A.; BECERRA, M. C.; PELLEGRINI, A.; ALBESA, I.; GEA, S. Induction of NADPH oxidase activity and reactive oxygen species production by a single *Trypanosoma cruzi* antigen. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 1531–1538, 2010.

GUTIERREZ, F. R. S.; MINEO, T. W. P.; PAVANELLI, W. R.; GUEDES, P. M. M.; SILVA, J. S. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 236–245, 2009.

HALL, B. F. *Trypanosoma cruzi*: mechanisms of entry into host cells. **Seminars in Cell Biology**, v. 4, p. 323–333, 1993.

HENRIKSSON, J.; DUJARDIN, J. C.; BARNABE, C.; BRISSE, S.; TIMPERMAN, G.; VENEGAS, J.; PETTERSSON, U.; TIBAYRENC, M.; SOLARI, A. Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. **Parasitology**, v. 124, p. 277-286, 2002.

HIYAMA, K.; HAMANO, S.; NAKAMURA, T.; NOMOTO, K.; TADA, I. IL-4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**, v. 87, p. 269–274, 2001.

HOFT, D. F.; EICKHOFF, C. S. Type 1 immunity provides both optimal mucosal and systemic protection against a mucosally invasive, intracellular pathogen. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 4934–4940, 2005.

HOLSCHER, C.; KOHLER, G.; MULLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G. A.; BROMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 1208–1215, 1998.

HUDSON, L.; SNARY, D.; MORGAN, S. J. *Trypanosoma cruzi*: continuous cultivation with murine cell lines. **Parasitology**, v. 88, p. 283-294, 1984.

IIDA, K.; WHITLOW, M. B.; NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* escape destruction by the terminal complement components. **Journal of Experimental Medicine**, v. 169, p. 881-891, 1989.

JANEWAY, C. A. Presidential Address to The American Association of Immunologists. The road less traveled by: the role of innate immunity in the adaptive immune response. **Journal of Immunology**, v. 161, p. 539-44, 1998.

JANMEY, P. A.; LAMB, J.; ALLEN, P. G.; MATSUDAIRA, P. T. Phosphoinositide-binding peptides derived from the sequences of gelsolin and villin. **Journal Biological Chemistry**, v. 15, p. 11818–11823, 1992.

JANSSENS, S.; BEYAERT, R. A. Universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signalling. **Trends in Biochemistry**, v. 27, p. 474–482, 2002.

JOINER, K. A.; SHER, A.; GAITHER, T.; HAMMER, C. Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor B. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 83, p. 6593-6597, 1986.

KANBARA, H.; UEMURA, H.; NAKAZAWA, S.; FUKAMA, T. Effect of low pH on transformation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigote. **Japanese Journal of Parasitology**, v. 39, p. 226–228, 1990.

KIPNIS, T. L.; DAVID, J. R.; ALPER, C. A.; SHER, A.; DA SILVA, W. D. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 78, p. 602–605, 1981.

KOGA, R.; HAMANO, S.; KUWATA, H.; ATARASHI, K.; OGAWA, M.; HISAEDA, H.; YAMAMOTO, M.; AKIRA, S.; HIMENO, K.; MATSUMOTO, M.; TAKEDA, K. TLR-dependent induction of IFN- β mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 7059–7066. 2006.

KREIER, J. P.; AL-ABBASSY, S.N.; SEED, T. M. *Trypanosoma cruzi* surface change characteristics of cultured epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 19, p. 10-20, 1977.

KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **Journal of Immunology**, v. 128, p. 2009-2012, 1982.

KUMAR, S.; TARLETON, R.L. The relative contribution of antibody production and CD8⁺ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunology**, v. 20, p. 207–216, 1998.

LEY, V.; ANDREWS, N. W.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. **Journal of Experimental Medicinal**, v. 168, p. 649-659, 1988.

LIEKE, T.; GRAEFE, S. E. B.; KLAUENBERG, U.; FLEISCHER, B.; JACOBS, T. NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 6817–6825, 2004.

LISBOA, C. V.; MANGIA, R. H.; RUBIÃO, E.; DE LIMA, N. R. C.; XAVIER, S. C. C.; PICINATTI, A.; FERREIRA, L. F.; FERNANDES, O.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* transmission in a captive primate unit, Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, v. 90, p. 97–106, 2004.

MARINHO, C. R. F.; NUÑEZ-APAIZA, L. N.; BORTOLUCI, K. R.; BOMBEIRO, A. L.; BUCCI, D. Z.; GRISOTTO, M. G.; SARDINHA, L. R.; JORQUERA, C. E.; LIRA, S.; LIMA, M. R. D.; ÁLVAREZ, J. M. Infection by the Sylvio X10/4 clone of *Trypanosoma cruzi*: relevance of a low-virulence model of Chagas' disease. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 1037-1045, 2009.

MARINHO, C. R. F.; NUÑEZ-APAIZA, L. N. ; MARTINS-SANTOS, R. ; BASTOS, K. R. B.; BOMBEIRO, A. L.; BUCCI, D. Z.; SARDINHA, L. R. ; LIMA; M. R. D.; ÁLVAREZ J. M. IFN- γ , but not nitric oxide or specific IgG, is essential for the *in vivo* control of low-virulence sylvio X10/4 *Trypanosoma cruzi* parasites. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, p. 297–308, 2007.

MAYER, M.; ROCHA LIMA, H. Zum verhalten von *Schyzotrypanum cruzi* in warmblütern und Arthropoden. **Arch. Schiffs. Tropen-Hyg**, v.18, p. 101-36, 1914.

McCABE, R.E.; REMINGTON, J. S.; ARAUJO, F.G. Mechanisms of invasion and replication of the intracellular stage in *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v.46, p. 372–376, 1984.

MEJÍA-JARAMILLO, A. M.; PEÑA, V. H.; TRIANA-CHÁVEZ, O. *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of lineages I and II supports the predominance of lineage I in Colombia. **Experimental Parasitology**, v. 121, p. 83–91, 2009.

MICALLEF, M. J.; OHTSUKI, T.; KOHNO, K.; TANABE, F.; USHIO, S.; NAMBA, M.; TANIMOTO, T.; TORIGOE, K.; FUJII, M.; IKEDA, M.; FUKUDA, S.; KURIMOTO, M. Interferon- γ -inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon- γ production. **European Journal of Immunology**, v. 26, p. 1647–51, 1996.

MICHAILEWSKY, V.; SILVA, N. M.; ROCHA, C. D.; VIEIRA, L. D.; LANNES-VIEIRA, J.; GAZZINELLI, R. T. Pivotal role of interleukin-12 and interferon- γ axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. **American Journal of Pathology**, v. 159, p. 1723-1733, 2001.

MILES, M. A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SAHAW, J. J.; LAINSON, R.; TOYÉ, P. J. Isoenzymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature**, v. 272, p. 819-821, 1978

MINEO, J. R.; Normas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I.(Ed). **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**, Uberlândia: Edufu, p. 81-111, 2005.

MINOPRIO, P.; BURLIN, O.; PEREIRA, P.; GUILBERT, B.; ANDRADE, L. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 28, p. 553–561, 1988.

MIYAZAKI, Y.; HAMANO, S.; WANG, S.; SHIMANOE, Y.; IWAKURA, Y.; YOSHIDA, H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**, v.185, p. 1150-7, 2010.

MOODY, T. N.; OCHIENG, J.; VILLALTA, F. Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. **FEBS Letters**, v. 470, p. 305–308, 2000.

MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on surface of HeLa cells. **Experimental Parasitology**, v. 73, p. 1-14, 1991

MORTARA, R. A.; PROCÓPIO, D. O.; BARROS, H. C.; VERBISCK, N. V.; ANDREOLI, W. K.; SILVA, R. B.; DA SILVA, S. Features of host cell invasion by different infective forms of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 135-137, 1999.

NDE, P. N.; SIMMONS, K. J.; KLESHCHENKO, Y. Y.; PRATAP, S.; LIMA, M. F.; VILLALTA, F. Silencing of the laminin γ -1 gene blocks *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 1643–1648, 2006.

NEIRA, I.; SILVA, F. A.; CORTEZ, M.; YOSHIDA, N. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 557-561, 2003.

NIEDERGANG, F.; CHAVRIER, P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. **Current Opinion in Cell Biology**, v.16, p. 422–428, 2004.

NOGUEIRA, N.; BIANCO, C.; COHN, Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 142, p. 224-229, 1975.

NUNES, L. R.; CARVALHO, M. R. C.; BUCK, G. A. *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader and rRNA gene promoters. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 86, p. 211-224, 1997.

NUSSBAUM, K.; HONEK, J.; CADMUS C. M.; EFFERTH, T. Trypanosomatid Parasites Causing Neglected Diseases. **Current medicinal chemistry**, v. 17, p. 1594-1617, 2010.

OGLE, C. K.; GUO, X. The effect of IL-3, IL-3+GM-CSF,L929 supernatant, IL-3 +L929 supernatant on the production of IL-6 by different populations of bone marrow macrophages. **Cytokine**, v. 6, p. 549, 1994.

OKAMURA, H.; TSUTSUI, H.; KASHIWAMURA, S.; YOSHIMOTO, T.; NAKANISHI, K. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. **Advances in Immunology**, v. 70, p. 281–312, 1998.

OLIVEIRA, A. C.; DE ALENCAR, B. C.; TZELEPIS, F.; KLEZEWSKY, W.; DA SILVA, R. N. Impaired Innate Immunity in TLR-4/2 Mice but Preserved CD8+ T Cell Responses against *Trypanosoma cruzi* in TLR-4-, TLR-2-, TLR-9- or MyD88-Deficient Mice. **PLoS Pathogens**, v. 6, p. 45-79, 2010.

OLIVEIRA, A. C.; PEIXOTO, R. J; ARRUDA, L. B; CAMPOS, M. A; GAZZINELLI, R. T. Expression of functional TLR-4 confers pro-inflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. **Journal of Immunology**, v. 173, p. 5688–5696, 2004.

OUAISSI, A.; GUILVARD, E.; DELNESTE, Y.; CARON, G.; MAGISTRELLI, G.; HERBAULT, N.; THIEBLEMONT, N.; JEANNIN, P. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 6366-6374, 2002.

PADILLA, A. M.; BUSTAMANTE, J. M.; TARLETON, R. L. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, p. 385–390, 2009.

PAN, S. C. T. *Trypanosoma cruzi*: In vitro interactions between cultured amastigotes and human skin-muscle cells. **Experimental Parasitology**, v. 45, p. 274-286, 1978a.

PAULNOCK, D. M. Macrophage activation by T cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 4, p. 344-349, 1992.

PROCÓPIO, D. O.; SILVA, S.; CUNNINGHAM, C. C.; MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi*: effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization and expression on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 90, p. 1-13, 1998.

PROCÓPIO, D. O.; BARROS, H. C.; MORTARA, R. A. Actin-rich structures formed during the invasion of cultured cells by infective forms of *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Cell Biology**, v. 78, p. 911-924, 1999.

PROCÓPIO, D. O.; SILVA, S.; CUNNINGHAM, C. C.; MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi*: effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization and expression on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 90, p. 1-13, 1998.

QUAISSI, M. A.; CORNETTE, J.; CAPRON, A. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 19, p. 201-211, 1986.

REED, S. G. *In vivo* administration of recombinant IFN γ induces macrophage activation and prevents acute disease immune suppression and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Journal of Immunology**, v. 140, p. 4342-4347, 1988.

RÊGO, S. F. M. Sobre o encontro de formas tissulares do *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909) no sangue circulante do camundongo branco (*Mus musculus*). **Folia Clinica et Biologica**, v. 26, p. 17-45, 1956.

RODRIGUES, M. M.; RIBEIRÃO, M.; BOSCARDIM, S. B. CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. **Immunology Letters**, v. 73, p. 43-50, 2000.

ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T.; SHER, A.; BAFICA, A.; SANTIAGO, H. C.; GOLDSZMID, R. TLR-9 and TLR-2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of immunology**, v. 177, p. 3515-3519, 2006.

SÁNCHEZ-SANCHO, F.; CAMPILLO, N. E.; PÁEZ, J. A. Chagas Disease: Progress and New Perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v.17, p.423-452, 2010.

SANTANA, J. M.; GRELLIER, P.; SCHRÉVEL, J.; TEIXEIRA, A. R. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. **Biochemical Journal**, v. 325, p. 129-137, 1997.

SCHARFSTEIN, J., MORROT, A. A role for extracellular amastigotes in the immunopathology of Chagas Disease. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.51-63, 1999.

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M. M. A.; LIMA, A.P.C.A.; MORROT, A.; JULIANO, L.; MÜLLER-ESTERL, W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B₂ receptors. **Journal Experimental Medicine**, v. 192, p. 1289-1299, 2000.

SCHENKMAN, S.; ANDREWS, N. W.; NUSSENZWEIG, V.; ROBBINS, E. S. *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. **Cell**, v. 55, p. 157-165, 1988.

SCHENKMAN, S.; GUTHER, M. L. S.; YOSHIDA, N. Mechanism of resistance to lysis by the alternative complement pathway in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes: effect of specific monoclonal antibody. **Journal Immunology**, v. 137, p.1623-1628, 1986.

SCHENKMAN, S.; MORTARA, R. A. HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Journal of Cell Science**, v.101, p. 895-905, 1992.

SCHENKMAN, S.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be dependent of the target cell cytoskeleton. **Infection and Immunity**, v.59, p. 645-654, 1991c.

SCOTT, M. T. The nature of immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice recovered from acute infection. **Parasite Immunology**, v. 3, p. 209–218, 1981.

SILVA, C. V. ; LUQUETTI, A. O. ; RASSI, A. ; MORTARA, RA . Involvement of Ssp-4-related carbohydrate epitopes in mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 2120-2129, 2006.

SILVA, C. V.; KAWASHITA, S. Y.; PROBST, C. M.; DALLAGIONVANNA, B. ; CRUZ, M. C.; DA SILVA, E. A.; SOUTO-PADRÓN, T. C. B. S.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; BRIONES, M. R. S.; ANDREWS, N. W.; MORTARA, R. A. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 563-570, 2009.

SILVA, C. V.; SILVA, E. A.; CRUZ, M. C.; CHAVRIER, P.; MORTARA, R. A. ARF6, PI3-kinase and host cell actin cytoskeleton in *Toxoplasma gondii* cell invasion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 378, p. 656–661, 2009.

SILVA, D. T.; NAZARETH, M.; MEIRELLES, S. L.; ALMEIDA, D.; URBINA, J. A.; PEREIRA, M. C. Cytoskeleton reassembly in cardiomyocytes infected by

Trypanosoma cruzi is triggered by treatment with ergosterol biosynthesis inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 530–537, 2006.

SILVERSTEIN, S. C.; STEINMAN, R.; COHN, Z. Endocytosis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 46, p. 669-722, 1977.

SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 83, p. 141-152, 1996.

STEINDEL, M.; DIAS, J. C. P.; ROMANHA, A. J. Doença de Chagas: mal que ainda preocupa. **Ciência Hoje**, v. 37, p. 32 – 38, 2005.

STURM, N. R.; VARGAS, N. S.; WESTENBERGER, S. J.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 269–279, 2003.

TALVANI, A.; RIBEIRO, C. S.; ALIBERTI, J. C. S. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN- γ as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 851–866, 2000.

TARDIEUX, I.; NATHANSON, M. H.; ANDREWS, N. W. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*- induced cytosolic free Ca^{2+} transients. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, p. 1017-1022, 1994.

TARDIEUX, I.; WEBSTER, P.; RAVESLOOT, J.; BORON, W.; LUNN, J. A.; HEUSER, J. E. et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 71, p. 1117-1130, 1992.

TARLETON, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, p. 430–434, 2007.

TODOROV, A. G.; ANDRADE, D.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; BADER, M.; STEWART, J.; GERA, L.; MULLER-ESTERI, W.; MORANDI, V.; GOLDENBERG, R. C.; NETO, H. C.; SCHARFSTEIN, J. *Trypanosoma cruzi* induces edematogenic responses in mice and invades cardiomyocytes and endothelial cells in vitro by activating distinct kinin receptor (B1/B2) subtypes. **FASEB Journal**, v. 17, p. 73 – 75, 2003.

TOMLINSON, S.; VANDEKERCKHOVE, F.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, V. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. **Parasitology**, v. 110, p. 547 – 554, 1995.

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

TURRENS, J. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, p. 211–220, 2004.

TYLER, K. M.; LUXTON, G. W. G.; APPLEWHITE, D. A.; MURPHY, S. C.; ENGMAN, D.M. Responsive microtubule dynamics promote cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Cellular Microbiology**, v. 7, p. 1579-1591, 2005.

UMEZAWA, E. S.; MILDER, R. V.; ABRAHAMSOHN, I. A. *Trypanosoma cruzi* amastigotes: development in vitro and infectivity in vivo of forms isolated from spleen and liver. **Acta Tropica**, v. 42, p. 25- 32, 1985.

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

VILLALTA, F.; SMITH, C.; RUIZ-RUANO, R.; LIMA, M. F. A ligand that *Trypanosoma cruzi* uses to bind to mammalian cells to initiate infection. **FEBS**

Letters, v. 505, p. 383–388, 2001.

WATFORD, W. T.; MORIGUCHI, M.; MORINOBU, A.; O'SHEA, J. J. O. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 14, p. 361–368, 2003.

WILKOWSKY, S. E.; BARBIERI, M. A.; STAHL, P.; ISOLA, E. L. D. *Trypanosoma cruzi*: phosphatidylinositol 3-Kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. **Experimental Cell Research**, v. 264, p. 211–218, 2001.

WILKOWSKY, S. E.; BARBIERI, M. A.; STAHL, P. D.; ISOLA, E. L. Regulation of *Trypanosoma cruzi* invasion of nonphagocytic cells by the endocytically active GTPases dynamin, Rab5, and Rab7. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 291, p. 516–521, 2002.

WITKE et al. In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. **EMBO Journal**, v. 17, p. 967–976, 1998.

WOOLSEY, A. M.; BURLEIGH, B. A.; Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. **Cellular Microbiology**, v. 6, p. 829–838, 2004.

WOOLSEY, A. M.; SUNWOO, L.; PETERSEN, C. A.; BRACHMANN, S. M.; CANTLEY, L. C. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. **Journal of Cell. Science**, v. 116, p. 3611–3622, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The World Health Report 2002: reducing Risk, Promoting Healthy Life. **World Health Organization**, 2002.

YEO, M.; ACOSTA, N.; LLEWELLYN, M.; SÁNCHEZ, H.; ADAMSON, S.; MILES, G. A.; LOPEZ, E.; GONZALEZ, N.; PATTERSON, J. S.; GAUNT, M. W.; DE ARIAS, A. R.; MILES, M. A. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II. Including hybrids. **International Journal of Parasitology**, v. 35, p. 225–233, 2005.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira Ciência**, v. 78, p. 87–111, 2006.

YOSHIDA, N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 40, p. 836-839, 1983.

ZACKS, M.; WEN, J.; VYATKINA, G.; BHATIA, V.; GARG, N. An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 77, p. 695–715, 2005.

ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R.; JANSENS, A.; FERNANDES, O. American Trypanosomiasis in Brazil based on dimorphism of rRNA and mini-exon sequences. **International Journal of Parasitology**, v. 28, p. 105-112, 1998.

ZINGALES, B.; STOLF, B. S.; SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M.R.S. Epidemiology, Biochemistry and Evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94. p. 159- 164, 1999.

ZINGALES, S. G.; ANDRADE, M. R.; MACHADO, A. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends *T. cruzi* I to TcVI, **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 104, pp. 1051–1054, 2009.