

Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Infectologia  
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Guilherme Augusto Roza

**Avaliação do perfil de citocinas produzidas em infecções de cepas  
brasileiras de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos intraperitoneais**

Uberaba-MG

2018

Guilherme Augusto Roza

**Avaliação do perfil de citocinas produzidas em infecções de cepas brasileiras de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos intraperitoneais**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Parasitologia e Imunologia Aplicadas do Curso de Pós Graduação em Medicina Tropical e Infectologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

**Orientador:** Prof. Dr. Wendell Sérgio Ferreira Meira

**Co-orientador:** Prof. Dr. André Luiz Pedrosa

Uberaba-MG

2018

**Catálogo na fonte:**

**Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

R796a Roza, Guilherme Augusto  
Avaliação do perfil de citocinas produzidas em infecções de cepas brasileiras de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos intraperitoneais / Guilherme Augusto Roza. -- 2018.  
78 f. : il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Infectologia) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018  
Orientador: Prof. Dr. Wendell Sérgio Ferreira Meira

1. Doença de chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Macrófagos peritoneais. 4. Imunidade. I. Meira, Wendell Sérgio Ferreira. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.937

Guilherme Augusto Roza

**Avaliação do perfil de citocinas produzidas em infecções de cepas  
brasileiras de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos intraperitoneais**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Parasitologia e  
Imunologia Aplicadas do Curso de Pós Graduação em  
Medicina Tropical e Infectologia da Universidade  
Federal do Triângulo Mineiro.

**Orientador:** Prof. Dr. Wendell Sérgio Ferreira Meira

**Co-orientador:** Prof. Dr. André Luiz Pedrosa

Uberaba, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Karine Rezende de Oliveira

Universidade Federal de Uberlândia

---

Dr. Helioswilton Sales de Campos

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Prof. Dr. Wendell Sérgio Ferreira Meira

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

*Dedico aos meus pais, que são os  
bens mais preciosos, meu porto seguro, meus  
exemplos de vida e meu amor incondicional.  
Ao Sidney, meu companheiro, meu amigo,  
meu conselheiro de todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

Em especial:

A Deus, a quem devo tudo o que tenho e sou, pelo o dom da vida, por sua presença continua, pelos dons concedidos e pelas inúmeras bênçãos concedidas, mesmo sendo indigno. Por sempre me levar em seus braços nos momentos difíceis. Ao meu Bom Deus agradeço por mais esse sonho realizado e por me conceder mais essa conquista.

Aos meus pais, a quem me faltam palavras para agradecer. Vocês sabem que tudo isso só foi possível graças a vocês, que tudo isso foi e sempre será para vocês. Obrigado por me concederem as oportunidades de estar sempre onde tive vontade e sempre onde almejei. Obrigado por me amarem de forma incondicional, até mesmo nos momentos que, infelizmente, acabei desagradando a vocês. Obrigado pelo amor, pelo carinho, pela torcida, por me apoiarem, por me escutarem e me aconselharem. Amo vocês eternamente. Meu amor por vocês só tende a crescer.

Aos meus irmãos, Wesley e Leandro, agradeço por sempre me apoiarem em minhas decisões e meus sonhos. A vocês agradeço por sempre me incentivarem a crescer. Obrigado pelo companheirismo, pelos momentos vivenciados juntos, pelo carinho e pelo amor de vocês.

Ao Sidney, meu porto seguro durante esse momento de minha vida. Agradeço a você por tudo que fez por mim, mas, principalmente por ser meu companheiro nos momentos difíceis e melhores. Obrigado por sempre estar ao meu lado, pelas inúmeras broncas, afim de me fazer crescer como pessoa. Agradeço por sempre me fazer feliz, me trazer conforto, amor e alegrias. Obrigado por tudo.

Ao Prof. Dr. Wendell Sérgio Ferreira Meira, a quem agradeço por me acolher nesse mundo fascinante da pesquisa. Obrigado pela confiança durante todo esse tempo, desde quando entrei no laboratório como aluno de Iniciação Científica. Obrigado por ser meu “pai científico”, e como qualquer outro pai, deu conselhos, broncas e elogios, mas, o principal, sempre me motivou a crescer e a sonhar. Por tudo que fez por mim, o meu eterno agradecimento. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. André Luiz Pedrosa, me diziam alguns que era um aluno em desvantagem, outros me diziam que era um aluno de sorte por ter não apenas um, mas, dois “pais científico”. Hoje vejo que realmente fui um aluno de sorte, pois, tive o privilégio de tê-lo como “pai científico”. Serei eternamente grato à você por tudo o que fez por mim nesses dois anos. Obrigado por me introduzir no imenso e encantador campo de conhecimento da Biologia Molecular e sempre estar disponível em me ensinar sobre este assunto. Obrigado por me acolher, me ensinar, orientar e pelas broncas que sei que foram para a minha construção como profissional e pessoal. Obrigado por tudo!

Ao Jonatas, Helioswilton, Cecília e Cesar, a vocês não sei nem por onde começar a agradecer. Vi o que realmente os amigos fazem, me socorreram em um dos momentos mais tortuoso do meu mestrado. Sem a colaboração de vocês esse trabalho não estaria aqui. Obrigado por vocês terem disponibilizado um pouco do tempo de vocês, do conhecimento e do companheirismo. Obrigado por me incentivarem a nunca desistir e a me mostrarem que em momentos complicados sempre teremos mãos amigas estendidas para nos ajudar. A vocês, peço que recebam tudo em dobro do que me ofereceram. Minha eterna gratidão e admiração!

A Lucila, obrigado “menina Lu” por ser uma amiga e companheira nesta jornada do meu mestrado. Obrigado pelos conselhos, dicas, ajuda em experimentos, pela paciência em me ensinar, pelos momentos deliciosos de risadas e descontração, e, claro, pelos momentos do café e das nossas “gordices”. Obrigado por me mostrar que nos momentos mais difíceis sempre temos a quem recorrer, dessa cena eu nunca vou me esquecer, você foi especial! Agradeço também pela colaboração em toda a parte de experimentos e de conhecimentos da Biologia Molecular aqui empregadas. Lu que Deus te abençoe muito, que você continue sempre ao meu lado. Obrigado por tudo!

A Tatiane Marques, como agradecer a uma pessoa que simplesmente foi a propulsora de toda essa minha conquista? A você Taty só tenho que agradecer por ser meu exemplo, por me incentivar, me ter feito crescer tanto. Obrigado minha amiga por tudo que você fez por mim, pelos momentos de ensinamento, de brigas, de conselho, de desabafos, de experimentos acompanhados de um repertório musical único e marcante. Obrigado pela companhia de sempre! Em você eu sei que poderei sempre contar para qualquer coisa nessa vida. E lembre-se, ainda temos muito para fazermos juntos! Amo muito você, obrigado.

Agradeço também:

A todos os meus amigos, cujo nomes não irei citar, pois vocês sabem quem são. Agradeço pela amizade constante de vocês e pela compreensão dos meus inúmeros momentos ausentes na vida de vocês durante essa jornada. Obrigado pelo apoio de vocês!

Aos professores deste curso de Pós-graduação, por me fazerem crescer como profissional, por me incentivarem a querer cada vez mais e mais, por todo o conhecimento que me ofereceram e pelas contribuições feitas para aperfeiçoar o nosso trabalho.

Aos colegas de pós-graduação, obrigado por fazerem dos laboratórios da pós-graduação um lugar de descontração, de alegrias e de boas risadas, mas de também de grande aprendizagem, onde cada um pode contribuir com o meu crescimento profissional e intelectual. Sem vocês seria complicado conseguir chegar até o final. Agradeço de coração a cada um de vocês.

Ao Prof. Dr. Carlo José de Oliveira Freire, que gentilmente e de forma tão generosa cedeu os animais aqui utilizados. Ao Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior, que cordialmente cedeu o laboratório de Imunologia, assim como os Kits comerciais de ELISA para a realização deste projeto.

A Manu, a quem agradeço pela amizade, companheirismo, pelos ensinamentos transmitidos e pela ajuda sempre disponível para realização deste projeto.

Aos funcionários do Laboratório de Parasitologia da UFTM, em especial a Cidinha e a Patrícia Lins, a vocês duas agradeço pela amizade construída. Obrigado pelo carinho que tem comigo. Agradeço por serem em diversos momentos pessoas que simplesmente me ouviram desabafar. Muito obrigado!

Enfim, agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho pudesse ser concluído.

*“Em seu coração o homem planeja o seu caminho, mas o Senhor determina os seus passos.”*

*(Provérbios 16:9)*

*Resumo*

---

## RESUMO

A doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e acomete cerca de 6 a 7 milhões de pessoas, principalmente na América Latina e ainda é considerada uma doença negligenciada. O *T. cruzi* possui três formas parasitárias, a amastigota, a epimastigota e as tripomastigotas (sanguínea-TCC e metacíclica-TMI), sendo essas últimas as responsáveis por infectar o ser humano. Este parasito possui grande variedade genética e são agrupados em *Discrete Typing Units* DTUs (TcI-TcVI) de acordo com similaridades genéticas. Esta infecção possui fase aguda e fase crônica, sendo esta com a presença das manifestações clínicas graves, como os megas (gástrico e/ou cardíaco). A resposta imune induzida frente ao parasito é essencial para definir essas manifestações, bem como controlar sua proliferação. Entretanto, esta resposta imune pode sofrer influência de vários fatores como: a cepa do parasito, forma infectante e fatores pré-dispostos pelo hospedeiro vertebrado. Desta forma, este estudo teve por objetivo avaliar a infecção em macrófagos peritoneais isolados de camundongos Balb/c e C57BL/6 com formas TCC e TMI obtidas das cepas AQ-4 e Hel de *T. cruzi*. Para isto, foram isolados macrófagos peritoneais de Balb/c e C57BL/6 e infetados *in vitro* com TCC e TMI das cepas AQ-4 e Hel. Após 4 horas e 24 horas de infecção, as produções de IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  foram avaliadas por ensaios de ELISA e NO determinado pela reação de Griess. Foi realizada também a determinação da DTU pertencente de cada cepa pela PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragments Length Polimorphims*), tendo como alvo a TcSC5D. Os macrófagos isolados de camundongos pertencentes a linhagem Balb/c foram maiores indutores de IL-6, TNF-  $\alpha$  e IL-10 quando comparado com os C57BL/6, em contrapartida, os macrófagos provenientes de C57 apresentaram maiores níveis de NO. A cepa AQ-4 apresentou maiores níveis de produção de TNF-  $\alpha$  e de IL-10 e, a cepa Hel para IL-6 e NO. As formas TCC mostraram maior produção de citocinas pró-inflamatórias do que as metacíclicas. Este estudo nos permitiu compreender sobre o início da resposta imune frente a diferentes cepas de *T. cruzi* isoladas no Brasil.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*, macrófagos peritoneais, resposta imune

*Abstract*

---

## ABSTRACT

Chagas disease (CD) is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and affects about 6 to 7 million people, mainly in Latin America and is still considered a neglected disease. *T. cruzi* has three parasitic forms, amastigote, epimastigote and trypomastigotes (blood – TCC and metacyclic – TMI), the latter being responsible for infecting humans. This parasite has a wide genetic variety and are grouped into Discrete Typing Units DTUs (TcI-TcVI) according to genetic similarities. This infection has an acute phase and a chronic phase, with the presence of severe clinical manifestations, such as the megas (gastric and / or cardiac). The induced immune response to the parasite is essential for defining these manifestations, as well as controlling their proliferation. However, this immune response may be influenced by several factors such as parasite strain, infective form and factors predisposed by the vertebrate host. Thus, this study aimed to evaluate the infection in peritoneal macrophages isolated from Balb/c and C57BL/6 mice with TCC and TMI forms obtained from *T. cruzi* strains AQ-4 and Hel. For this, Balb / c and C57BL/6 peritoneal macrophages were isolated and infected in vitro with TCC and TMI from strains AQ-4 and Hel. After 4 hours and 24 hours of infection, IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  productions were evaluated by ELISA and NO determined by Griess reaction. The determination of the DTU belonging to each strain was also performed by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragments Length Polimorphims), targeting TcSC5D. Macrophages isolated from mice belonging to the Balb/c strain were higher inducers of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10 when compared to C57BL/6, in contrast, macrophages from C57 showed higher NO levels. The AQ-4 strain presented higher levels of TNF- $\alpha$  and IL-10 production and the Hel strain for IL-6 and NO. CBT forms showed higher production of proinflammatory cytokines than metacyclic ones. This study allowed us to understand the onset of immune response to different strains of *T. cruzi* isolated in Brazil.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, peritoneal macrophages, immune response

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Características morfológicas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	22
<b>Figura 2.</b> Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	24
<b>Figura 3.</b> Distribuição geográfica das <i>Discrete Typing Units</i> (DTU) do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	25
<b>Figura 4.</b> Distribuição das DTUs de <i>Trypanosoma cruzi</i> nos países da América do Sul.	24
<b>Figura 5.</b> Modelos da evolução de “duas hibridizações” e de “três ancestrais” do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	28
<b>Figura 6.</b> Resposta imune inata e adquirida durante a infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> ..	31
<b>Figura 7.</b> Células da linhagem mielocítica percussoras dos macrófagos.....	32
<b>Figura 8.</b> Ativação dos macrófagos e origem das populações M1 e M2.....	33
<b>Figura 9.</b> Mecanismos de evasão do sistema complemento do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	35
<b>Figura 10.</b> Mapa das placas de 24 poços com os cultivos de macrófagos infectados com as formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> das cepas AQ-4 e Hel.	47
<b>Figura 11.</b> Produtos da amplificação das regiões subteloméricas do <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i> a partir do DNA genômico extraído das culturas axênicas em meio LIT das cepas AQ-4 e Hel de <i>T. cruzi</i> revelados em gel de agarose 1,5% .....	50
<b>Figura 12.</b> Produtos da amplificação do gene TcSC5D e da digestão pelas enzimas <i>SpaI</i> e <i>SphI</i> do DNA genômico extraído das culturas axênicas em meio LIT das cepas Hel e AQ-4 para determinação de DTU .....	51

<b>Figura 13.</b> Quantificação da produção de Óxido Nítrico nas culturas de macrófagos peritoneais isolados dos camundongos C57BL/6 e Balb/c infectados com tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	52
<b>Figura 14.</b> Quantificação da produção da citocina IL-6 nas culturas de macrófagos peritoneais isolados dos camundongos Balb/c infectados com tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	54
<b>Figura 15.</b> Quantificação da produção da citocina IL-6 nas culturas de macrófagos peritoneais isolados dos camundongos C57BL/6 infectados com tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	55
<b>Figura 16.</b> Quantificação da produção de TNF- $\alpha$ nas culturas de macrófagos peritoneais isolados dos camundongos C57BL/6 e Balb/c infectados com tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	55
<b>Figura 17.</b> Quantificação da produção da citocina IL-10 nas culturas de macrófagos peritoneais isolados dos camundongos C57BL/6 e Balb/c infectados com tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	56
<b>Figura 18.</b> Esquema da produção das citocinas IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ e de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de Balb/c e C57BL/6 após infecção pelas cepas AQ-4 e Hel de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

× g: aceleração da gravidade no sistema MKS (9,8 m/s<sup>2</sup>)

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CRIT: proteína trispanante de inibidor do receptor C2

DC: Doença de Chagas

DEAE-C: dietilaminoetil celulose

DMEM/F-12: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

dNTP: desoxirribonucleotídeo trifosfatado

DTU: *Discrete Typing Units*

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

Gp: Glicoproteína

GPI: glicosilfosfatidilinositol

IFN- $\gamma$ : Interferon-gama

IgG: Imunoglobulina G

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-2: Interleucina 2

IL-6: Interleucina 6

LIT: *Liver Infusion Tryptose*

LPC: lisofosfatidilcolina

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade

MK2: células epiteliais de rim de macaco *Rhesus*

mM: milimolar

NF-kb: fator de transcrição nuclear kappa B

ng: Nanograma

NK: células *Natural Killer*

NO: Óxido Nítrico

PAMPs: Padrões Moleculares Associados à Patógenos

pb: pares de bases

PBS: *phosphate-buffered saline*

PCR *duplex*: reação em cadeia da polimerase *duplex*

PCR-RFLP: *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragments Length Polimorphims*

pH: Potencial Hidrogeniônico

pmol: picomol

PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrões

SFB: soro fetal bovino

*T. cruzi*: *Trypanosoma cruzi*

Taq DNA Polimerase: DNA Polimerase da bactéria *Thermus aquaticus*

TAU: *Artificial Triatomine Urine*

TCC: tripomastigotas de cultura celular

Tc-CRP: Proteína de *Trypanosoma cruzi* com atividade Reguladora do Complemento

T-T-DAF: fator de aceleração do enxerto de tripomastigotas

TcI: *Trypanosoma cruzi* I

TcII: *Trypanosoma cruzi* II

TcIII: *Trypanosoma cruzi* III

TcIV: *Trypanosoma cruzi* IV

TcSC5D: *Sterol C-5 Desaturase* de *T. cruzi*

TcV: *Trypanosoma cruzi* V

TcVI: *Trypanosoma cruzi* VI

Th1: Células T *helper* 1

Th2: Células T *helper* 2

TLR: Receptores do Tipo Toll

TMI: tripomastigotas metacíclicas infectantes

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$

UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1 Doença de Chagas .....	21
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	21
1.2.1 Ciclo Biológico e características morfológicas e formas evolutivas .....	21
1.2.2 Diversidade genética do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	25
1.3 Interação parasito-hospedeiro.....	28
1.4 Resposta imune contra o <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	29
1.4.1 Papel dos macrófagos durante a infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	32
1.4.2 Mecanismos de evasão do sistema imune .....	34
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	36
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	39
3.1 Objetivo geral .....	40
3.2 Objetivos específicos .....	40
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	41
4.1 Aspectos éticos e apoio financeiro .....	42
4.2 Seleção das cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	42
4.2.1 Obtenção das formas tripomastigotas de cultura celular .....	42
4.2.2 Obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas infectantes.....	44
4.3 Caracterização das cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	44
4.3.1 Extração de DNA.....	44
4.3.2 Análise de ácidos nucleicos .....	44
4.3.3 Caracterização das DTUs .....	45
4.4 Obtenção dos macrófagos peritoneais de camundongos .....	46
4.4.1 Infecção dos macrófagos peritoneais.....	46
4.5 Quantificação de Óxido nítrico.....	47
4.6 Quantificação das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ .....	48
<b>5 RESULTADOS</b> .....	49
5.1 Caracterização das cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	50
5.2 Quantificação da produção de óxido nítrico.....	51
5.3 Quantificação da produção de IL-6 .....	53
5.4 Quantificação da produção de TNF- $\alpha$ .....	54

5.5	Quantificação de IL-10.....	56
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>75</b>
9.1	Anexo A – Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais .....	76

# *1. Introdução*

---

## 1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e acomete cerca de 6 a 7 milhões de pessoas, principalmente na América Latina onde é endêmica em 21 países e ainda é considerada uma doença negligenciada (WHO, 2017). Esta doença foi descrita pela primeira vez pelo pesquisador Carlos Chagas durante uma expedição em Lassance-MG, onde descobriu os sinais e sintomas, identificou o agente causador, modo de transmissão, o seu vetor e seus hospedeiros (Chagas, 1909).

Os mecanismos da transmissão do *T. cruzi* podem ser classificados em primário e secundário. Os mecanismos primários são o vetorial, transfusão de sangue, transmissão oral e congênita. Já os secundários tendem a ser menos frequentes que os primários, e estes podem ser os acidentes de laboratório, manuseio de animais infectados, ingestão de carne não cozida de animais infectados, transplantes de órgãos e transmissão sexual (Coura, 2015).

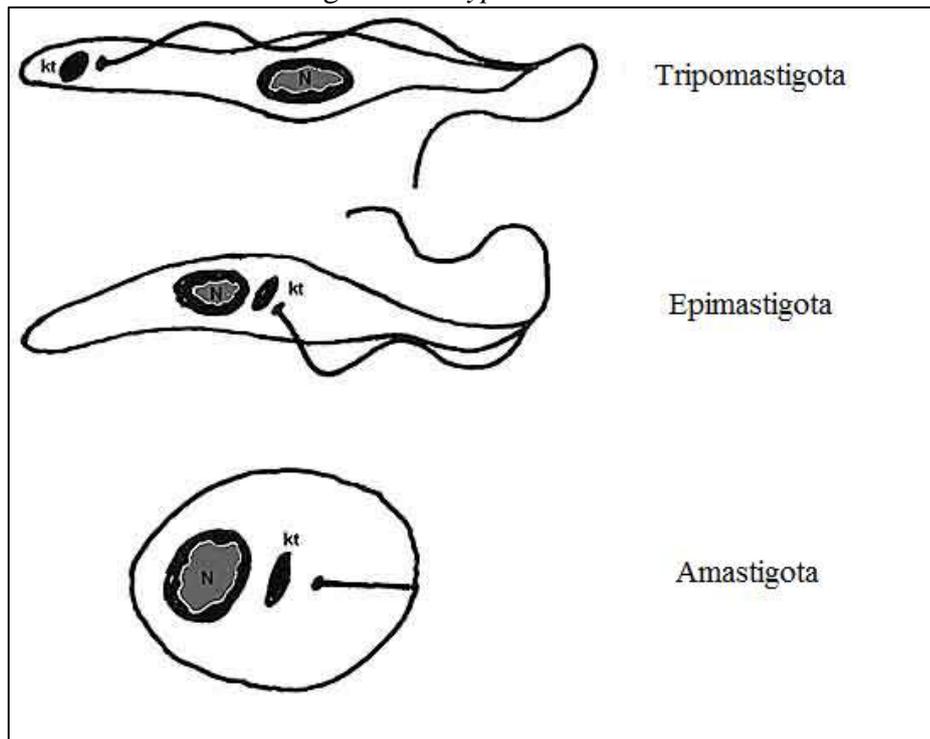
A evolução clínica é caracterizada por duas fases: fase aguda e fase crônica. Durante a fase aguda, é possível a visualização das formas circulantes do parasito no sangue, e, na maioria das vezes, esta fase é assintomática, o que dificulta um diagnóstico precoce da doença. Quando sintomática pode apresentar sintomas como febre, chagoma de inoculação, edema palpebral (ou Sinal de Romana), miocardite, hepato-esplenomegalia e miocardite aguda. A fase crônica tem como característica baixa parasitemia e a maioria dos pacientes serem assintomáticos por durante anos. As manifestações clínicas que aparecem durante essa fase da doença possuem formas variadas, decorrente à grande variedade genética do parasito e os fatores que o paciente predispõe. As manifestações clínicas mais encontradas são as formações das megasíndromes no trato digestivo e no tecido cardíaco (Wegner e Rohwedder, 1972; Pinto et al., 2008; Pérez-Molina e Molina, 2017).

## 1.2 *Trypanosoma cruzi*

### 1.2.1 *Ciclo biológico, características morfológicas e formas evolutivas*

O agente etiológico da DC é o *T. cruzi*, um protozoário flagelado, pertencente a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Este parasito possui como hospedeiro invertebrado o triatomíneo (Reduviidae), também conhecido popularmente como “barbeiro” e como hospedeiro vertebrado os mamíferos, incluindo o ser humano. Durante o ciclo biológico o parasito apresenta diversas formas morfológicas: amastigotas, epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas infectantes, tripomastigotas sanguíneas (FIG. 1). As amastigotas são formas arredondadas, possuem uma bolsa flagelar, núcleo centralizado e cinetoplasto próximo ao núcleo. Essas formas são encontradas no hospedeiro vertebrado, são intracelulares e responsáveis pela multiplicação do parasito por divisão binária (Contreras et al., 2002; Navarro et al., 2003; Rossi et al., 2003).

Figura 01 – Características morfológicas do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Adaptado de (Rossi et al., 2003)  
N: Núcleo; Kt: cinetoplasto

As formas epimastigotas são encontradas no intestino do triatomíneo, são extracelulares e, assim como a amastigotas, realizam multiplicação por divisão binária. As epimastigotas têm formato alongado, núcleo centralizado, cinetoplasto anterior ao núcleo, além de uma membrana ondulante que percorre metade de seu comprimento e um flagelo exteriorizado. Estas formas epimastigotas não possuem a capacidade de infectar o hospedeiro vertebrado, pois não expressam proteínas que ajudam os parasitos a invadirem as células-alvos e a evadirem a

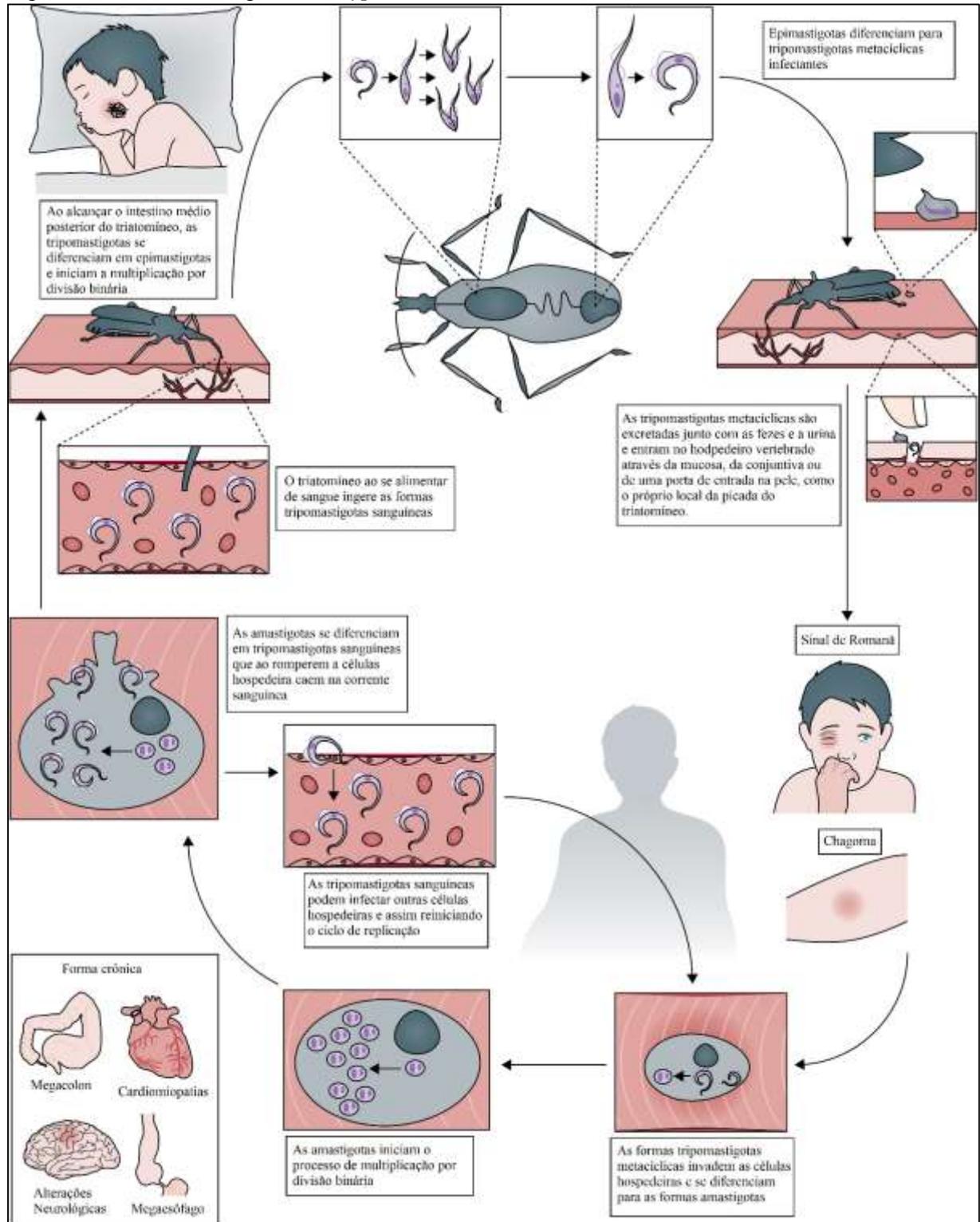
resposta imune (Contreras et al., 2002; Navarro et al., 2003; Rossi et al., 2003; Kessler et al., 2017).

As formas tripomastigotas podem ser divididas em formas metacíclicas e sanguíneas. As primeiras estão presentes na ampola retal do triatomíneo e são eliminadas nas fezes destes insetos. As metacíclicas são as principais formas responsáveis pela infecção nos hospedeiros vertebrados. As tripomastigotas sanguíneas são encontradas no sistema circulatório do hospedeiro vertebrado e também podem infectar hospedeiro vertebrado. Ambas as formas são alongadas e mais delgadas que as epimastigotas, apresentam o núcleo centralizado e cinetoplasto em posição posterior ao núcleo. A membrana ondulante percorre por toda a extensão do corpo e possuem um flagelo exteriorizado. As tripomastigotas não se dividem como as amastigotas e as epimastigotas, mas possuem a capacidade de evadirem do sistema imune, bem como do dano pelo estresse oxidativo e de aderirem e invadirem células hospedeiras devido a expressão das glicoproteínas (gp) de membranas, como as gp160, gp58, calreticulina e a proteína denominada de fator de aceleração do enxerto de tripomastigota (T-DAF) (Contreras et al., 2002; Navarro et al., 2003; Kessler et al., 2017).

O ciclo biológico (FIG.2) se inicia quando um triatomíneo realiza repasto sanguíneo em um mamífero infectado com o *T. cruzi*, ingerindo as formas tripomastigotas sanguíneas. Ao alcançar o intestino posterior médio, as tripomastigotas sofrem o processo de epimastigogênese e se diferenciam em formas epimastigotas (Dias, 1934; Kessler et al., 2017). Estas formas epimastigotas começam a multiplicar por divisão binária e, ao alcançarem o intestino posterior aderem as membranas perimicrovilares do triatomíneo. Este processo de adesão inicia a metaciclogênese, em que se diferenciam para as formas tripomastigotas metacíclicas infectantes e migram até a porção da ampola retal onde são eliminadas juntamente com as fezes e a urina. As tripomastigotas metacíclicas infectantes ao entrarem no organismo do hospedeiro vertebrado necessitam evadirem do sistema imune para instalarem a infecção neste hospedeiro. Esta evasão ocorre devido a expressão de proteínas como a gp160, calreticulina, gp58 e a T-DAF na membrana das tripomastigotas. Essas formas interagem e invadem as células do hospedeiro, sendo os macrófagos um dos principais alvos para o *T. cruzi* no início da infecção. Ao invadirem essas células, iniciam outro processo de diferenciação, a amastigogênese, diferenciando para as formas amastigotas, que iniciam a proliferação por diversas divisões binárias. Após sucessíveis divisões, as amastigotas iniciam a tripomastigogênese, processo em que se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas, e devido ao movimento constante dos flagelos rompem a membrana celular sendo liberadas na corrente sanguínea, podendo infectar

novas células ou infectar outro triatomíneo quando o mesmo ingerir esse sangue (Longo et al., 2015; Costales e Rowland, 2007; De Souza, 2002; Pérez-Molina e Molina, 2017).

Figura 02 – Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

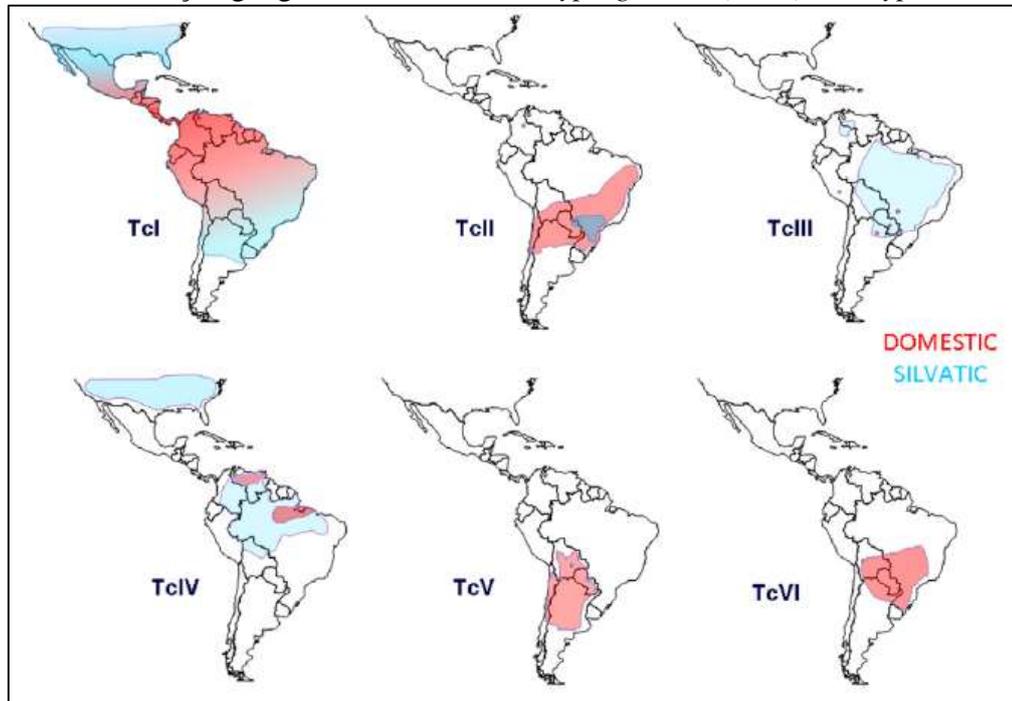


Fonte: Adaptado de (Pérez-Molina & Molina, 2017)

### 1.2.2 Diversidade genética do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* possui grande variedade genética e fenotípica, fazendo dele uma espécie heterogênea. Marcadores genéticos e moleculares ajudam a determinar essa diversidade do *T. cruzi* e agrupá-los em seis grupos de acordo com suas *Discrete Typing Units* (DTU) TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI (Tibayrenc, 1998; Brisse, et al., 2000; Zingales et al., 2009). Um outro fator interessante envolvido com essa diversidade genética é a sua influência no tropismo tecidual do *T. cruzi*, o que resulta em manifestações clínicas diferentes para cada DTU (Andrade et al., 1999). As populações pertencentes a esses grupos possuem outras similaridades, como a distribuição geográfica e o ciclo de transmissão do parasito (FIG. 3).

Figura 03 – Distribuição geográfica das *Discrete Typing Units* (DTU) do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Adaptado de (Zingales et al., 2009)

A DTU TcI possui uma grande distribuição geográfica, sendo encontrada em toda a América Latina e sul dos Estados Unidos. É encontrada tanto no ciclo silvestre quanto no doméstico. Os parasitos pertencentes a este grupo têm uma predominância no parasitismo tecidual pelo miocárdio, o que resulta nas cardiopatias como manifestações clínicas (Brenière et al., 2016).

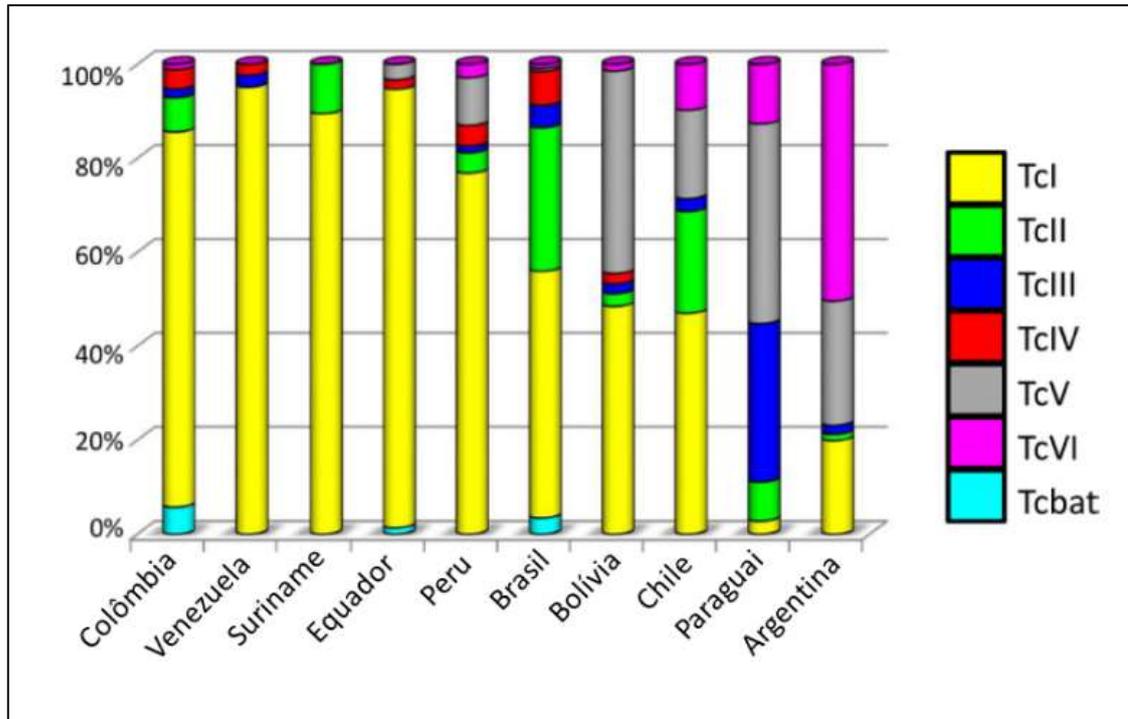
O grupo TcII está relacionado com a transmissão no ciclo doméstico no cone sul da América do Sul e desenvolve tanto as cardiopatias como as megasíndromes. Quanto às

populações de *T. cruzi* do grupo TcIII estão presentes nos ciclos silvestres e raramente ocorre algum relato de infecção no ser humano por parasitos deste grupo. O grupo TcIV é encontrado na América do Norte e na região norte da América do Sul e os parasitos deste grupo estão relacionados ao ciclo silvestre. Os grupos TcV e TcVI estão presentes na região do cone sul da América do Sul e relacionados com o ciclo doméstico, resultando na ocorrência das megasíndromes e as cardiopatias como manifestações clínicas (Zingales et al., 2009; Zingales et al., 2012; Brenière et al., 2016).

No Brasil a distribuição das DTUs é variada, sendo possível detectar membros de todos os grupos, entretanto, o destaque é para o grupo TcI e TcII (FIG. 04) (Brenière et al., 2016). O grupo TcI é o mais frequentemente detectado na América do Sul, cerca de 58, 2%, e no Brasil está relacionado com os casos de doença Chagas aguda na região da Amazônia e casos de infecção por via oral nesta região (Zingales, 2017; Brenière et al., 2016; Messenger et al., 2015; Monteiro et al., 2012; Marcili et al., 2009;). Dados publicados entre 2005 e 2014 indicam que os casos de DC nas formas indeterminadas ou na cardíacas no norte do Brasil, mostra maior prevalência de parasitos do grupo TcI nestes pacientes (Messenger et al., 2015).

O grupo TcII é predominantemente isolado em amostras de pacientes no Brasil, cerca de 66% dos casos na região central e sudeste (Brenière et al., 2016). Estudos mostram que este grupo está relacionado com a forma crônica da doença em diversos países da América do Sul, inclusive no Brasil, onde é encontrado em pacientes crônicos na região sudeste do Brasil com as formas indeterminadas, cardíacas ou digestivas. (Cura et al., 2012; del Puerto et al., 2010; Carranza et al., 2009; Zingales, 2017).

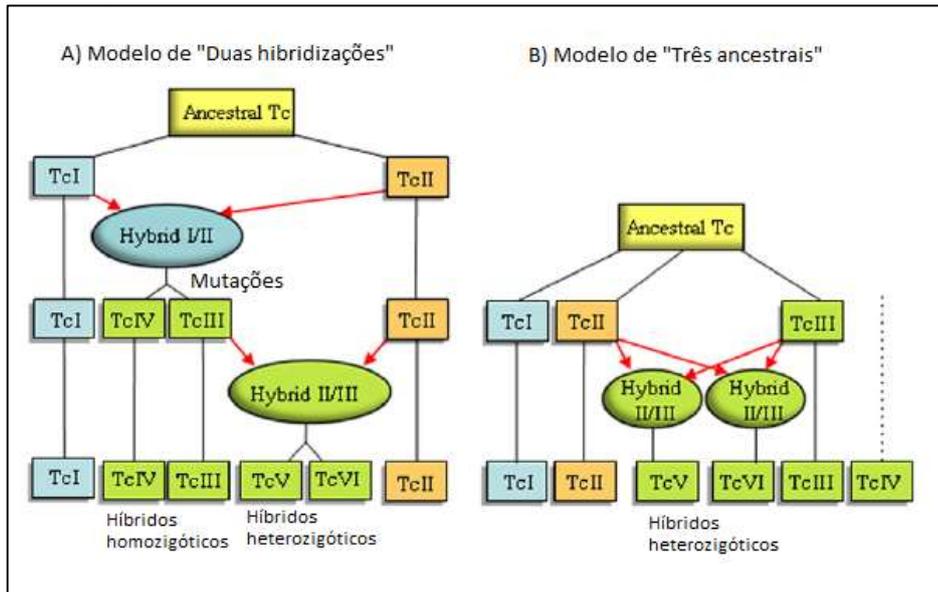
Figura 04 – Distribuição das DTUs de *Trypanosoma cruzi* nos países da América do Sul



Fonte: adaptado de: (Brenière et al., 2016)

O padrão evolutivo do *T. cruzi* é predominantemente por propagação clonal, ou seja, a linhagem progênie é geneticamente semelhante à linhagem parental, e por eventos de recombinação genética, resultam em linhagens híbridas que após estabilizadas voltam sua evolução por propagação clonal (Zingales et al., 2012). Para explicar essa evolução foi proposto dois modelos, o modelo de duas hibridizações e o de três ancestrais com dois eventos de hibridização (FIG. 5). No primeiro modelo acredita-se em uma troca genética entre os grupos TcI e TcII com perda de heterogenicidade, dando origem aos grupos TcIII e TcIV. A origem dos grupos TcV e TcVI veio de um segundo evento de hibridização entre os grupos TcII e TcIII. No segundo modelo há três ancestrais, TcI, TcII e TcIII, os grupos TcV e TcVI surgiram após eventos de troca genética entre os grupos TcII e TcIII (Westenberger et al., 2005; Freitas et al., 2006; Zingales et al., 2012).

Figura 05 – Modelos da evolução de “duas hibridizações” e de “três ancestrais” do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Adaptado de (Zingales et al., 2012)

### 1.3 Interação parasito-hospedeiro vertebrado

As tripomastigotas metacíclicas ao entrarem no organismo do hospedeiro vertebrado iniciam vários mecanismos para invadirem as células alvo, evadirem do sistema imune e para evitar danos causados pelo estresse oxidativo. Os mecanismos que facilitam a interação do *T. cruzi* com as células hospedeiras iniciam durante a picada do triatomíneo, em que a presença da lisofosfatidilcolina (LPC) na saliva destes insetos tem a função anti-hemostática, impedindo a agregação plaquetária e aumentando a vaso dilatação, além de função quimiotaxia atraindo macrófagos para o local da picada, desta forma, facilitando a interação do parasito com estas células (Mesquita et al., 2008; Guarneri e Lorenzo, 2017). Os mecanismos de invasão celular são intrínsecos e dinâmicos, envolvendo múltiplos fatores, tanto do parasito, quanto do hospedeiro. O *T. cruzi* pode infectar células fagocíticas e não-fagocítica por mecanismos de invasão ativa ou passiva (Walker et al., 2014).

Os processos de invasão em células não-fagocíticas são dependentes da ligação de glicoproteínas (gp) de membranas expressas nos parasitos e seus receptores presentes nas membranas das células hospedeiras. Componentes das famílias trans-sialidases, as gp82, 90, 85 e 30, são as principais proteínas envolvidas no início da invasão celular (Egima et al., 1998;

Weston et al., 1999). A gp82 e a gp30 ao se ligarem em seus receptores presentes nas células hospedeiras desencadeiam a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto no parasito quanto na célula hospedeira. Alguns parasitos também expressam a gp35/50, uma proteína relacionada com a interação a mucina e também resultam na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  da célula hospedeira. Esta glicoproteína é fundamental para os casos de infecção por *T. cruzi* por via oral (Yoshida, 2006).

Esse influxo de cálcio é essencial para o recrutamento e fusão dos lisossomos com a membrana celular no local da interação do parasito (Walker et al., 2014). A exocitose dos lisossomos ocorre por sua fusão com a membrana superficial que provoca a liberação de esfingomielinase, que gera ceramida através da clivagem da esfingomielinina (Fernandez et al., 2011). A formação de ceramida no folheto externo da membrana induz endocitose da membrana ferida e as tripomastigotas aproveitam desse evento para se internalizar nestes endossomos com base em lisossomos e assim invadem as células não-fagocíticas através de um método de invasão dependente de lisossomo (Walker et al., 2014).

As tripomastigotas também podem invadir células fagocíticas por meio da ativação das proteínas da tirosina quinase seguido pelo recrutamento de filamentos de cinase e de actina PI-3 (de Souza et al., 2010). Os parasitos ao invadirem os macrófagos são alojados em vacúolos parasitóforos, e logo evadem, pois a fusão dos lisossomos com os vacúolos anula esse processo de saída, impedindo que o parasito se desenvolva (Andrade e Andrews, 2004).

#### **1.4 Resposta imune contra o *Trypanosoma cruzi***

A fase crônica e a fase aguda da doença de Chagas possuem perfis de resposta imune distintas contra o parasito. No primeiro momento da infecção há um desencadeamento da resposta imune inata com aumento das citocinas Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina (IL)-12 e de óxido nítrico (NO). Com a evolução da infecção o repertório imunológico torna-se específico com participação de linfócitos T e B, produção de anticorpos como a imunoglobulina G (IgG), produção de citocinas como IL-12 e IFN- $\gamma$ , e ativação de macrófagos (Tarleton, 2007; Camargo et al., 2014).

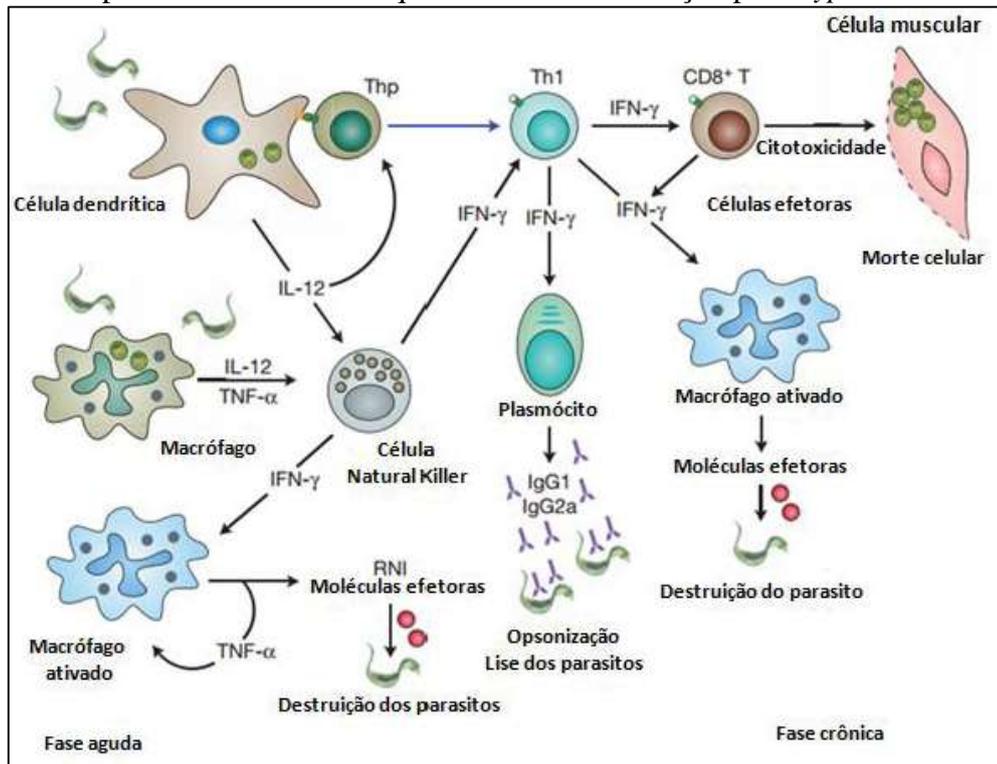
Os componentes da resposta imune inata como macrófagos, células *Natural Killer* (NK) e as células dendríticas, possuem funções cruciais na resposta contra o *T. cruzi*, principalmente na detecção e reconhecimento dos padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) por

meio dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), dentre eles os receptores do tipo Toll (TLR) (Tarleton, 2007). As âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) presentes na membrana de superfície do parasito são uns dos principais PAMPs e são potentes ativadores dos TLR2 e TLR6 (Campos et al., 2001). Estudos demonstram que fragmentos do DNA genômico do *T. cruzi* estimulam macrófagos e células dendríticas a produzirem citocinas pró-inflamatórias através do reconhecimento por TLR9, ativando o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ b) via MyD88 o que resulta na produção de TNF- $\gamma$  e interleucina (IL) 2 (Rodrigues et al., 2012).

As células NK tem características protetoras sobre a infecção, pois elas são as principais produtoras de IFN- $\gamma$ , que além de provocarem a lise dos alvos reconhecidos pelos PRRs e atuarem como células apresentadoras de antígenos para as células que compõem a resposta imune adaptativa (Sathler-Avelar et al., 2009). Os macrófagos durante a infecção por *T. cruzi* aumentam a produção de IL-12 que estimula as células NK a produzirem mais IFN- $\gamma$  e IL-12 produzida pelos macrófagos também faz retroalimentação nestas células acarretando em aumento da produção da própria IL-12, de TNF- $\alpha$  e de NO, que contribuem para a eliminação do parasito (Camargo et al., 1997). Além disso, os macrófagos também ativam as células T e B ao apresentarem antígenos via Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe I (Tarleton, 2007).

A fase crônica da DC, requer a participação das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> controlando o parasito, sem eliminá-lo (Tarleton et al., 1994; Cuellar et al., 2009). Cerca de 30% dos pacientes são sintomáticos na fase crônica, e mecanismos como a resposta imune disfuncional e o genótipo do parasito estão relacionados no desenvolvimento destes sintomas (Ripoll et al., 2017). A ativação das células T CD8<sup>+</sup> é primordial para o controle da infecção causada pelo *T. cruzi*, visto que essas células secretam perforinas e granzimas que induzem atividades citotóxicas nas células hospedeiras. Além disto, estas células estimulam a produção de IFN- $\gamma$  que desencadeia a produção de IL-12, TNF- $\alpha$  nos macrófagos, resultando na eliminação do parasito (Camargo et al., 1997) (FIG. 6).

Figura 06 – Resposta imune inata e adquirida durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*



Durante a invasão do *T. cruzi*, a imunidade inata desempenha um papel primordial na resistência do hospedeiro à infecção pois atua como a primeira barreira onde as células pertencentes a esse sistema (macrófagos, NK e células dendríticas) produzem citocinas (IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e moléculas efetoras (reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio) que controlam a multiplicação do parasito. Ao mesmo tempo, células da resposta imune inato, particularmente, as células dendríticas, fazem uma ligação entre a imunidade inata e adquirida, produzindo citocinas (IL-12) necessárias para a diferenciação e expansão clonal de células T auxiliar 1 (T helper 1 – Th1) CD4<sup>+</sup>, assim como células T CD8<sup>+</sup> e B. O IFN- $\gamma$  produzido por células Th1 CD4<sup>+</sup> ou células T CD8<sup>+</sup>, ativam os macrófagos, que destroem as formas amastigotas e as tripomastigotas fagocitadas, enquanto que a atividade citotóxica realizada pelas células T CD8<sup>+</sup> destroem células com as formas amastigotas internalizadas (Junqueira et al., 2010).

Estudos afirmam que anticorpos anti-*T. cruzi* são os responsáveis pela sobrevivência de camundongos susceptíveis durante a fase aguda da infecção, além de manter os níveis de parasitemia baixo na fase crônica. A ativação policlonal de células B na fase aguda e na fase crônica é vista em camundongos infectados. Este evento provoca uma hipergamaglobulinemia poliisotípica caracterizadas por produção aumentada de IgG2a e IgG2b específicos anti-*T. cruzi* (Spinella et al., 1992; El Bouhdidi et al., 1994).

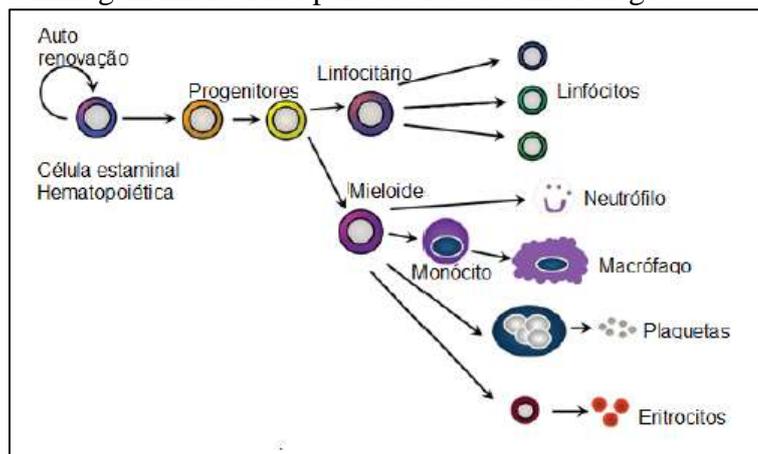
Durante a infecção causada pelo *T. cruzi* há respostas que mediam a produção de citocinas anti-inflamatórias para contra balancear as citocinas pró-inflamatórias, afim de prevenir lesões nos tecidos infectados. As principais citocinas anti-inflamatórias são as IL-10 e a TGF- $\beta$  (Fator de Transformação do Crescimento Beta) (Li e Flavell, 2008). A resposta do tipo Th2 está envolvida nesse mecanismo de produção de citocinas anti-inflamatórias, ao passo que

a resposta do tipo Th1 tem efeito protetor, produzindo uma resposta anti-*T. cruzi* (Tarleton, 2000).

#### 1.4.1 Papel dos macrófagos durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*

Os macrófagos são células primordiais do sistema imunológico, participando da imunidade inata e condicionando a adaptativa. São células hematopoiéticas fagocíticas proveniente da medula óssea, por meio da linhagem mieloide/fagocítica mononuclear, sendo que os monócitos são seus precursores que circulam temporariamente na corrente sanguínea e que migram para os tecidos onde se diferenciam (Appelberg, 2005) (FIG. 07).

Figura 07 – Células da linhagem mielocítica precursoras dos macrófagos



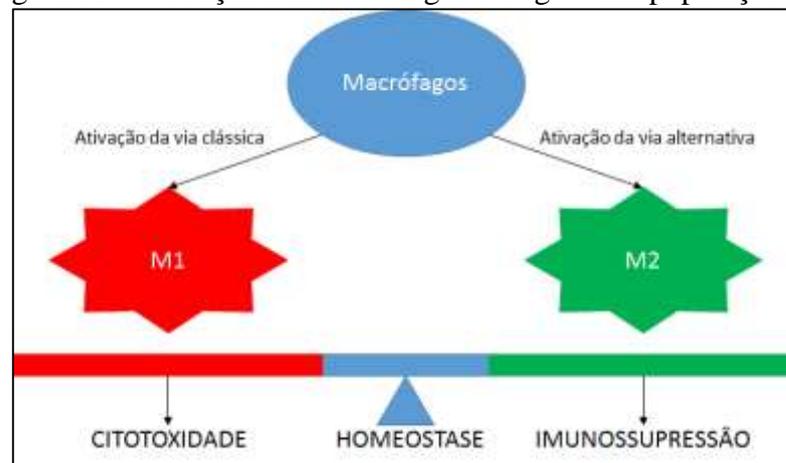
Fonte: adaptado de (King e Goodell, 2011)

Os macrófagos são fundamentais para possibilitar um funcionamento normal do hospedeiro através do controle dos processos que inibem ou estimulam as ações inflamatórias, do desenvolvimento de tecidos e da sua cicatrização. Entretanto, os macrófagos podem ter também um impacto no agravamento de certas patologias, por exemplo, na doença de Chagas (de la Torre et al., 2008; Gutierrez et al., 2009; Epelman et al., 2014).

Os macrófagos são ativados por duas vias, a clássica e a alternativa. Estas duas vias dão origem a macrófagos M1 e M2, respectivamente, que possuem diferentes designações e finalidades, devendo se encontrar num estado de equilíbrio para um conveniente funcionamento do sistema imunológico (FIG 08) (Mosser e Edwards, 2008; Geissmann et al., 2010). Os

macrófagos M1 desempenham um papel fundamental na proteção a patógenos intracelulares e a células cancerígenas em virtude da sua grande atividade citotóxica. A ativação clássica é mediada por estímulos do IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , receptores TLR e lipopolissacáridos, resultando na produção de IL-1, IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$ , bem como o NO (Geissmann et al., 2010). Os macrófagos M2 se originam da ativação da via alternativa mediada pela IL-4, IL-10 e IL-13 e desencadeia a secreção de IL-10, por exemplo. Este macrófago promove a limpeza de possíveis detritos e está relacionado a eliminação de patógenos extracelulares. (Pixley e Stanley, 2004; Nathan, 2014).

Figura 08 – Ativação dos macrófagos e origem das populações M1 e M2



Fonte: adaptado de: (Miron et al., 2013)

Os macrófagos são uns dos alvos principais do *T. cruzi*, além de serem elementos essenciais para a compor a resposta imune contra o parasito. Uma vez que esta célula internaliza o parasito ocorre um aumento na produção de TNF- $\alpha$  e IL-12 secretadas pelos macrófagos. Esta IL-12 produzida estimula as células *Natural Killer* (NK) a aumentarem a secreção de IFN- $\gamma$ , que tem função de ativar os macrófagos e estes produzem moléculas efetoras, por exemplo o NO, que eliminam o parasito. Esta citocina IFN- $\gamma$  também atua nas células T, fazendo que estas se diferenciem para um perfil Th1. O TNF- $\alpha$  secretado por esses macrófagos na presença do parasito também atua no estímulo das células NK assim como a IL-12. Os macrófagos possuem a capacidade de se ativerem com essas citocinas em uma retroalimentação, e desta forma conseguem eliminar o *T. cruzi* (Tarleton, 2000; Junqueira et al., 2010).

Ambas citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) infectados induzem uma grande produção de NO em macrófagos por meio da atividade enzimática do óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que oxida a l-arginina e transfere os elétrons do NADPH (fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida) (Cardoso et al., 2016).

O NO ao reagir com o oxigênio (O<sub>2</sub>) produz o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), um oxidante potente e uma molécula de atividade citotóxica altamente eficiente contra o *T. cruzi* (Radi, 2013; Alvarez et al., 2011; Cardoso et al., 2016). O peroxinitrito lesiona as células por meio da peroxidação lipídica, resultando na perda da integridade da membrana e a função da proteína da membrana, bem como a função mitocondrial, o que resulta em morte celular (Radi, 2013; Cardoso et al., 2016). Além disso, os radicais livres intermediários produzidos a partir de ONOO<sup>-</sup>, por exemplo dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>), hidroxilo (OH) e carbonato CO<sub>3</sub>, conseguem colaborar com a oxidação e nitração de proteínas, lipídios e DNA, levando a mutações e erros de transcrição (Piacenza et al., 2013; Radi, 2013). O estresse oxidativo causado pelo NO também é prejudicial para o hospedeiro, por ser capaz de causar danos aos tecidos (Gutierrez et al., 2009).

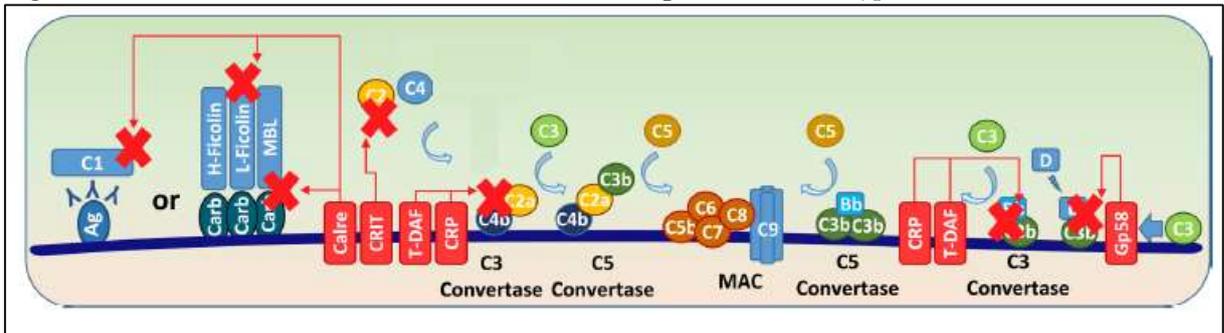
#### 1.4.2 Mecanismos de evasão do sistema imune

O *T. cruzi* possui uma série de mecanismos para evadir da resposta imune do hospedeiro vertebrado, o que resulta na persistência do parasito e desenvolvimento de infecção crônica (Zhang e Tarleton, 1999; Paiva et al., 2012; Galizzi et al., 2013). Esses mecanismos de evasão dependem de fatores como a variabilidade de antígenos de superfícies do parasito, produção de moléculas que possuem a capacidade imunodulação e a resistência a ação do sistema complemento que permite a permanência do parasito (DosReis, 2011).

As tripomastigotas metacíclicas e as sanguíneas expressam proteínas capazes de inibir o sistema complemento, como a gp160, também conhecida como Proteína de *Trypanosoma cruzi* com atividade Reguladora do Complemento (Tc-CRP), gp58/68, calreticulina e a proteína denominada de fator de aceleração do enxerto de tripomastigota (T-DAF) (Tambourgi et al., 1993; Ramirez et al., 2010; Norris et al., 1991). As Tc-CRPs são glicoproteínas ancoradas na superfície das tripomastigotas e são capazes de inibir a formação do C3 convertase, assim como as T-DAF (Norris et al., 1991; Tambourgi et al., 1993). As calreticulinas e as gp58/68 (gp58)

reprimem as fases iniciais da via clássica e da lectina ou alternativa, respectivamente. Já a proteína trispanante de inibidor do receptor C2 (CRIT) é capaz de inibir a via de ativação da lectina e impossibilitar a ação do complemento (Idos et al., 2009) (FIG. 09).

Figura 09 – Mecanismos de evasão do sistema complemento do *Trypanosoma cruzi*



Para reprimir a lise, o *T. cruzi* depende de moléculas, como calreticulina e gp58, que bloqueiam as fases iniciais das vias clássica/lectina ou alternativa, respectivamente, e CRIT, T-DAF, CRP que perturbam ou bloqueiam a montagem C3 convertase. Ag, antígeno; Carb, carboidrato; Calre, calreticulina (Cardoso et al., 2016).

O *T. cruzi* dispõe de um sistema antioxidante que tem a capacidade de invalidar os efeitos do NO e íons superóxidos nos fagossomos de macrófagos. Esse mecanismo é composto por enzimas detoxificadoras que produzem e utilizam compostos redutores a fim de inativar os reativos do oxigênio, resultando na sobrevivência do parasito que não é destruído e pode alcançar o citoplasma da célula hospedeira e assim iniciar seu processo de multiplicação (Nagajyothi et al., 2012).

## *2. Justificativa*

---

## 2 Justificativa

As manifestações clínicas da doença de Chagas são decorrentes do perfil da resposta imune do hospedeiro vertebrado montada frente ao *T. cruzi*. Sabe-se que os mecanismos da resposta imune são intrínsecos e dinâmicos e envolvem múltiplos fatores, tanto do parasito como a diversidade genética, expressão de proteínas, quanto do hospedeiro, como o perfil de resposta imune, fatores genéticos e condições clínicas.

O parasito possui grande diversidade genética que pode estar diretamente relacionada com diferentes manifestações clínicas da doença, devido que a expressão de proteínas de membrana parece estar diretamente relacionada a essa diversidade. Estas proteínas são essências na interação com o hospedeiro, pois estão relacionadas com a interação com as células alvos, bem como evadir da resposta imune ou até mesmo influenciar na montagem desta resposta ao serem apresentadas como antígenos.

Além disso, as formas evolutivas do parasito, as tripomastigotas metacíclicas e tripomastigotas procíclicas (de cultura ou sanguíneas), são infectivas para o ser humano e possuem expressão de proteínas diferentes, ou seja, podem acarretar em respostas imunes distintas. Portanto, avaliar essa resposta frente a essas formas evolutivas do parasito se faz necessário para melhor compreender essa interação e avaliar possíveis divergências que podem estar relacionadas em possíveis futuras manifestações clínicas no hospedeiro.

Durante o curso da infecção por *T. cruzi* a resposta imune que o hospedeiro monta corrobora na evolução dessa infecção, visto que o controle da proliferação do parasito pode ou não ser controlada, da mesma forma que a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias pode acarretar em dano para o hospedeiro. Os macrófagos são componentes fundamentais essa resposta, pois são os primeiros a controlarem a proliferação do parasito na fase aguda, bem como iniciar a produção de NO e de citocinas como a IL-12, TNF- $\alpha$ , que em excessos podem causar danos ao hospedeiro.

A diversidade da população de macrófagos produzidos pelo hospedeiro também possui papel fundamental no curso da infecção, pois podem induzir uma resposta mais protetora ou não. Macrófagos da população M1 estão relacionados a uma resposta mais protetora para o hospedeiro, pois estes induzem a produção de NO e de citocinas, como IL-12, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que conseguem eliminar o parasito. Já os macrófagos M2 estão relacionados a uma

imunossupressão, induzindo a produção de IL-10, por exemplo, que tem ação de regulação negativa nas respostas inflamatórias, realizando uma homeostase desta resposta, o que pode acarretar em uma falha do controle do parasito e acarretar em uma suscetibilidade à infecção. Desta forma, o *background* genético apresentado pelo hospedeiro em desenvolver mais macrófagos M1 ou M2 também influencia no percurso da infecção pelo *T. cruzi*.

Portanto, este trabalho se justifica na importância de avaliar a influência do *background* genético dos macrófagos isolados de linhagens distintas de camundongos durante o curso da infecção por *T. cruzi* em diferentes cepas e DTUs, bem como em formas infectivas (metacíclicas e procíclicas). Desta forma, este trabalho visa em compreender o perfil de citocinas produzidas por esses macrófagos e a produção de moléculas efetoras, como o NO.

### *3. Objetivos*

---

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de infecção por cepas de *T. cruzi* em macrófagos peritoneais isolados de camundongos Balb/c e C57BL/6 com formas tripomastigotas de cultura e metacíclicas.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar a genotipagem segundo as DTU's dos isolados de *T. cruzi*;
2. Avaliar a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c e C57BL/6 após infecção com formas tripomastigotas de *T. cruzi*;
3. Correlacionar as diferentes formas de obtenção das tripomastigotas de *T. cruzi* com os níveis de óxido nítrico produzidos pelos macrófagos peritoneais;
4. Quantificar os níveis das citocinas IL-10, IL-6 e TNF- $\alpha$  produzidas por macrófagos peritoneais das diferentes linhagens de camundongos com formas tripomastigotas de *T. cruzi*;
5. Correlacionar as diferentes formas de obtenção das tripomastigotas de *T. cruzi* com os níveis das citocinas IL-10, IL-6 e TNF- $\alpha$  produzidas pelos macrófagos peritoneais;

## *4. Materiais e métodos*

---

#### 4.1. Aspectos éticos e apoio financeiro

O projeto referente a esta dissertação foi submetido à apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFTM, sob protocolo de nº 23085.003914/2017-91 (anexo A). Para a realização das atividades previstas foram utilizados recursos materiais e financeiros provenientes da UFTM e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

#### 4.2. Seleção das cepas de *Trypanosoma cruzi*

Foram utilizadas duas cepas de *T. cruzi*: AQ-4 e Hel, obtidas do banco de cepas da Disciplina de Parasitologia da UFTM. A cepa AQ-4 foi isolada do vetor silvestre, *Triatoma sordida*, em Águas Quente – Bahia, enquanto a cepa Hel foi isolada de um paciente. Esses parasitos foram mantidos em diferentes formas de cultivo para obter as formas tripomastigotas que posteriormente foram utilizadas para infectar *in vitro* os macrófagos peritoneais, conforme descrito a seguir.

##### 4.2.1. Obtenção das formas tripomastigotas de cultura celular

Para a obtenção das formas tripomastigotas de cultura celular (TCC), foram utilizadas células epiteliais de rim de macaco *Rhesus* (MK2) cultivadas em meio DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,12% de carbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) e 10µL/mL de Gentamicina. Essas culturas foram mantidas em incubadoras à 37°C e 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

Após a proliferação das células MK2, estas foram incubadas juntamente com tripomastigotas metacíclicas de ambas as cepas de *T. cruzi*. As formas TCC foram recuperadas no sobrenadante das culturas após 10 dias da infecção. Este sobrenadante foi centrifugado à 500 x g por 5 minutos em temperatura ambiente, afim de obter um sobrenadante livre das formas

amastigotas do parasito. O sobrenadante foi novamente centrifugado à 2000 ×g por 10 minutos à 4°C, posteriormente os parasitos foram ressuspensos em 2mL de soro fisiológico 0,9% e feito a contagem das formas TCC em câmara de Neubauer e aplicada a seguinte equação numérica para obter o total de parasitos:

$\text{Total de parasitos} = \text{número de parasitos contado em 25 campos} \times 10^4 \times \text{volume do meio}$
--

Um total de  $5 \times 10^5$  TCC foram utilizadas para infectar os macrófagos peritoneais conforme descrito no item 5.4.1.

#### 4.2.2. Obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas infectantes

Para obter as formas tripomastigotas metacíclicas infectantes (TMI), foram mantidas culturas das formas epimastigotas em meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (CAMARGO, 1964) suplementado com SFB 10% e mantidas em uma temperatura constante de 27°C. Em intervalos de três dias foi feito o acompanhamento do desenvolvimento e crescimento das formas epimastigotas através de confecção de lâminas contendo 5µL do meio e feito análise em microscópio óptico na objetiva de 400×. Conforme a necessidade, foi acrescentado meio LIT aos tubos de cultura até atingirem o volume final de 30mL. Após atingirem o volume final, aguardou até o momento em que os parasitos alcançaram a fase estacionária de seu crescimento e foram submetidos à metacicligeneses *in vitro* através do meio de cultura TAU (*Artificial Triatomine Urine*) (Contreras V. T., *et al.*, 1985).

Os meios de culturas foram centrifugados a 2.000 ×g, por 10 minutos a 4°C, de modo a obter um pellet de epimastigotas, o qual foi ressuspensado em meio TAU e incubado por duas horas a 28°C. Após esse período de incubação, foi realizada nova centrifugação a 2.000 × g, por 10 minutos a 4°C, e o pellet de parasitos obtidos foi ressuspensado em 10 mL meio TAU suplementado com L-prolina, ácido glutâmico, ácido aspártico e glicose (Contreras V. T., *et al.*, 1985), e mantido em garrafas de cultura de 25cm<sup>3</sup> à temperatura constante de 28°C sem nenhum tipo de agitação por 4 dias. No quarto dia, foi coletado o sobrenadante do meio de cultura para

recolher as formas TMI. Esse sobrenadante foi centrifugado a  $2.000 \times g$ , por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , de modo a obter um pellet de parasitos o qual foi ressuspendido em 2mL de soro fisiológico 0,9% e feito purificação por coluna de dietilaminoetil celulose (DEAE-C) para a obtenção de formas metacíclicas. A contagem das formas TMIs foi realizada em câmara de Neubauer e  $5 \times 10^5$  TMIs foram utilizadas para infectar os macrófagos peritoneais conforme descrito no item 5.4.1.

### 4.3. Caracterização genética das cepas de *Trypanosoma cruzi*

#### 4.3.1. Extração de DNA

A extração do DNA (ácido desoxirribonucleico) genômico foi feita utilizando um kit comercial Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit da Promega seguindo o protocolo do fabricante. A extração foi feita de  $1 \times 10^7$  epimastigotas de ambas as cepas obtidas do meio de cultivo em meio LIT. Após a extração, a quantificação do DNA extraído foi realizada no Nanodrop<sup>®</sup>.

#### 4.3.2. Análises de ácidos nucleotídeos

Para identificar o *T. cruzi* e confirmar que a cultura não tinha contaminação pelo protozoário flagelado *Trypanosoma rangeli*, foi utilizada o protocolo de reação em cadeia da polimerase *duplex* (PCR *duplex*) descrita por Chiurillo e colaboradores em 2003. Esta PCR *duplex* tem como alvo as regiões subteloméricas do *T. cruzi* e do *Trypanosoma rangeli*. Para o *T. cruzi* o alvo da PCR foi uma junção telomérica utilizando os iniciadores Tc189Fw (5'-CCAACGCTCCGGGAAAAC-3') e o Tc189Rv (5'-GCGTCTTCTCAGTATGGACTT-3') que amplificam um fragmento de 100bp. Para detectar o *T. rangeli* o alvo foi uma região subtelomérica utilizando os iniciadores TrF3 (5'-CCCCATACAAAACACCCTT-3') TrR8 (5'-TGGAATGACGGTGC GGCGAC-3') que amplifica um fragmento de 170bp.

As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 30 µL contendo 0,24 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 30 mM de KCl, 0,4 µM dos iniciadores, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 50ng de DNA genômico. O programa de amplificação foi de desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 40 segundos, anelamento à 55°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 40 segundos, a extensão final de 72°C por 10 minutos. Foi utilizado uma amostra de DNA da cepa Cas4 de *T. rangeli* como controle positivo para este parasito. As amplificações foram confirmadas em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

#### 4.3.3. Caracterização das DTUs

Para determinar as DTUs das cepas de *T. cruzi* foi utilizada a PCR- *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) que teve como alvo o gene TcSC5D (*Sterol C-5 Desaturase* de *T. cruzi*) (Cosentino e Agüero, 2012). Foram utilizados os iniciadores TcSC5D-fwd (5'-GGACGTGGCGTTTGATTTAT-3') e TcSC5D-rev (5'-TCCCATCTTCTTCGTTGACT-3') que amplificam um fragmento de 832bp que contém o polimorfismo associado com o sítio de restrição da endonuclease *HpaI* e/ou *SphI*. Nesse fragmento os sítios de restrição da *HpaI* são encontrados em homozigidade no grupo TcI (resulta em fragmentos de 177 e 655bp) e no grupo TcII (231 e 601bp), já os sítios de restrição da *SphI* são encontrados em homozigidade no grupo TcIII (337 e 495bp). O grupo TcIV não possui os sítios de restrição da *HpaI* ou *SphI* no fragmento de 832bp. Os grupos TcV e TcVI possuem os sítios de restrição de ambas endonucleases em heterozigidade no fragmento de 832bp (gerando fragmentos de 231, 337, 495 e 601bp em ambos os grupos).

Os protocolos foram seguidos de acordo como foi descrito por Cosentino e Agüero, 2012. As reações foram feitas em um volume final de 25 µL contendo 10 pmol de cada iniciador, tampão de PCR (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 1,6 mM, DNA genômico de 50-100 ng, dNTPs 200 mM e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As condições de PCR foram as seguintes: 94 ° C durante 5 min; 35 ciclos de 94 ° C por 30 s; 55 ° C por 30 s; 72 ° C por 30 s; e extensão final a 72 ° C durante 5 min para amplificação de TcSC5D. Os produtos amplificados foram observados em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio.

Foram retiradas alíquotas de 20 µL dos produtos amplificados que foram digeridas com 1U da enzima *HpaI* (NEB R105) a 55 ° C durante 1 h e com 1U da enzima *SphI* (NEB R0182) a 37 ° C durante 1 h. Foi utilizado uma amostra da cepa CL Brener, previamente caracterizada como TcVI, como controle positivo da ação das enzimas *HpaI* e *SphI*. Os fragmentos resultantes da digestão foram observados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

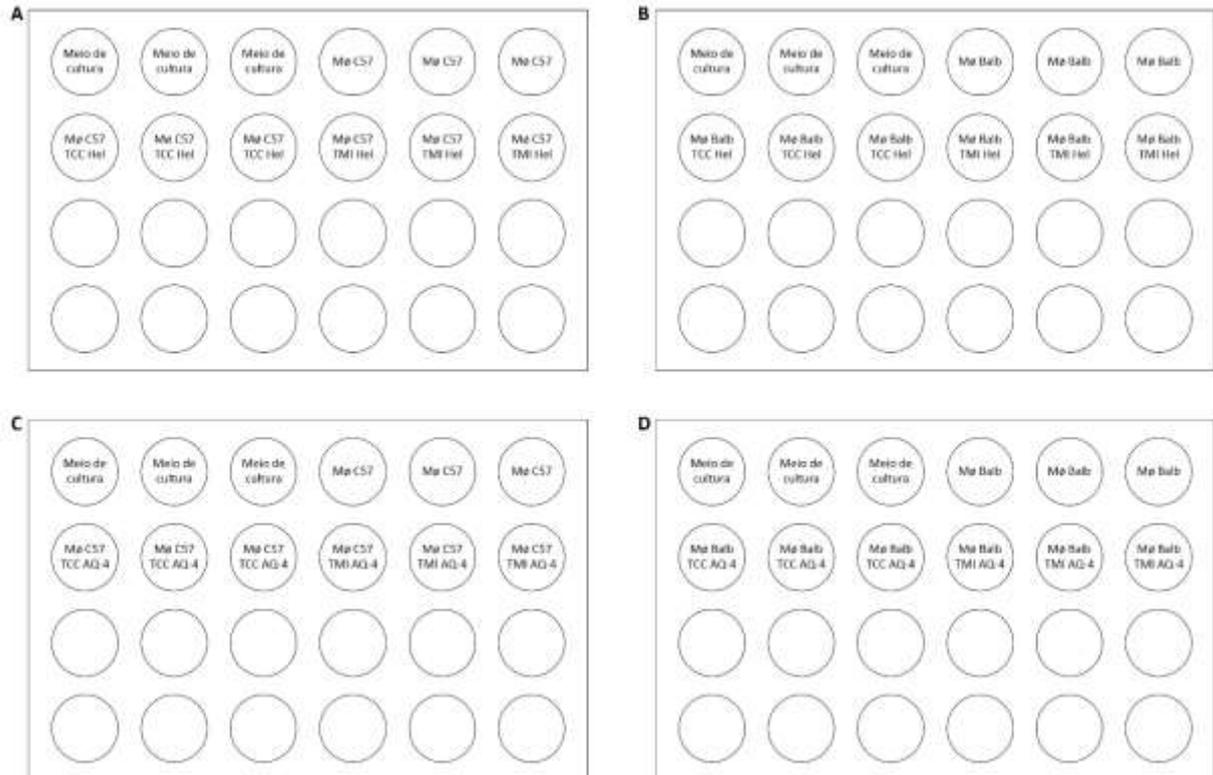
#### **4.4. Obtenção dos macrófagos peritoneais de camundongos**

Foram utilizados cinco camundongos da linhagem C57BL/6 e cinco Balb/c machos, com idade de 6 a 8 semanas com peso entre 20-25g, para isolar os macrófagos peritoneais. Foi feita estimulação de proliferação de macrófagos peritoneais com a aplicação de 1mL de tioglicolato a 3% por via intraperitoneal em cada animal. Após 3 dias, esses animais foram anestesiados com tiopental sódico, eutanasiados por deslocamento cervical e feito lavado com soro fisiológico 0,9% gelado da região peritoneal, afim de obter os macrófagos. Esse lavado foi centrifugado à 2000 x g por 10 minutos à 4°C, e o pellet obtido foi ressuscitado em meio DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de SFB, 0,12% de NaHCO<sub>3</sub> e 10µL/mL de Gentamicina. Foi realizado a quantificação das células obtidas em câmara de Neubauer e 1x10<sup>5</sup> macrófagos foram cultivados em cada poço de uma placa de cultivo de 24 poços em um volume final de 1000µL e incubado a 37°C 5% de CO<sub>2</sub> por 3 horas para as células aderirem no fundo da placa.

##### *4.4.1. Infecção dos macrófagos peritoneais*

Após os macrófagos serem transferidos para as placas e aguardado o período para se aderirem, foi inoculado em cada poço de cultura 5x10<sup>5</sup> de cada forma de tripomastigotas de cada cepa, conforme esquema representado na figura 10. Portanto, tivemos as TCC e TMI das cepas AQ-4 e Hel inoculados em macrófagos de camundongos C57BL/6 e de Balb/c. Esse experimento foi feito em três réplicas técnicas.

Figura 10 – Mapa das placas de 24 poços com os cultivos de macrófagos infectados com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* das cepas AQ-4 e Hel.



**A.** Placa de cultivo de macrófagos intraperitoneais isolados dos camundongos C57BL/6 infectados com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Hel. **B.** Placa de cultivo de macrófagos intraperitoneais isolados dos camundongos Balb/c infectados com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Hel. **C.** Placa de cultivo de macrófagos intraperitoneais isolados dos camundongos C57BL/6 infectados com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa AQ-4. **D.** Placa de cultivo de macrófagos intraperitoneais isolados dos camundongos Balb/c infectados com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa AQ-4. TCC: Tripomastigotas de cultura celular, TMI: Tripomastigotas metacíclicas infectantes, m $\emptyset$ : macrófagos.

#### 4.5. Quantificação do óxido nítrico (NO)

Após 4 e 24 horas da infecção dos macrófagos com as formas tripomastigotas das cepas AQ-4 e Hel, foi feita a determinação de NO utilizando a reação de Griess (Huygen, 1970), na qual é feita a quantificação de nitrito no sobrenadante de cultura de macrófagos como parâmetro indireto da produção de NO. Para tanto, foram acrescentados 50 $\mu$ L do sobrenadante de cultura dos macrófagos descrito no item 5.4.1 em cada poço e, em seguida adicionados 50 $\mu$ l da solução de revelação na diluição 1:1 das soluções de 1% sulfanilamida em 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e solução 0,1%

NEED. A quantificação de NO foi feita através da leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 554nm. Os resultados foram calculados a partir de uma curva-padrão (NaNO<sub>2</sub>) e expressos em µM entre os limites de detecção de 7,81 pg/µL a 1000pg/µL.

#### 4.6. Quantificação das citocinas IL-6, IL-10 e TNF-α

Para quantificar a produção da IL-6, IL-10 e TNF-α foi feito pelo ELISA (*Enzyme Likend ImmunonoSorbent Assay*) utilizando os kits comerciais, seguindo os protocolos de ensaios conforme determinado pelo fabricante (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Resumidamente, foram adicionados 100µL/poço do anticorpo de captura diluídos em tampão fostato (para ensaio da IL-10 e TNF-α) e tampão carbonato de sódio (para ensaio da IL-6). As placas foram incubadas *overnight* a 4°C.

Após esse período de incubação, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS 1x com 0,05% de Tween). Foram acrescentados 200µL/poço de PBS/SFB 1% para bloquear os sítios de ligação desocupados e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e adicionados 100µL das amostras do sobrenadante de todas as condições de culturas descritas no item 5.4.1 e citocinas recombinantes em diluições de concentrações conhecidas foram plaqueadas. Essas placas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente e logo após foram lavadas. Adicionou-se 100µL/poço de anticorpo de detecção juntamente com streptavidina e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. Após a lavagem foram adicionados 100µL/ poço de tetrametilbenzadina e incubado por 30 minutos em local escuro e em temperatura ambiente. Após esse período de incubação foram adicionados 50µL/poço de solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N).

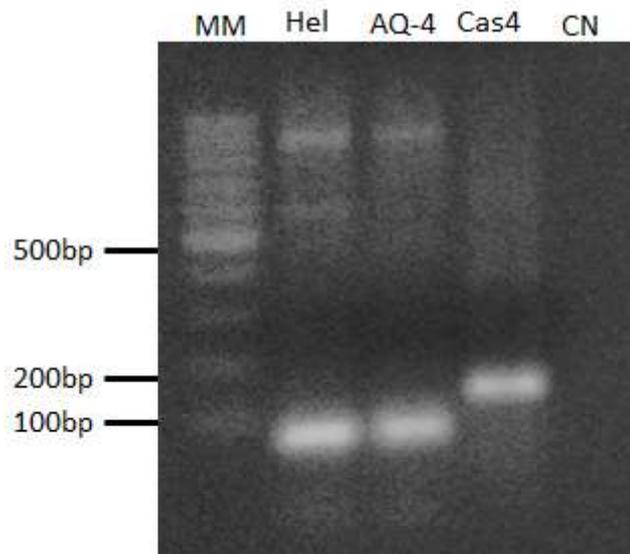
## *5. Resultados*

---

### 5.1. Caracterização genética das cepas de *T. cruzi*

Foram utilizadas neste estudo duas cepas de *T. cruzi* e para confirmar que a cultura axênica era pura foi feita a PCR-duplex para a amplificação das regiões subteloméricas do *T. cruzi*, gerando fragmento de 100bp, e *T. rangeli*, com fragmento de 170bp. A figura 11 mostra o gel com a amplificação do DNA extraído das culturas axênicas em meio LIT de ambas as cepas, mostrando que não havia contaminação por *T. rangeli*, o que resultou em uma cultura pura de *T. cruzi*.

Figura 11 – Produtos da amplificação das regiões subteloméricas do *T. cruzi* e *T. rangeli* a partir do DNA genômico extraído das culturas axênicas em meio LIT das cepas AQ-4 e Hel de *T. cruzi* revelados em gel de agarose 1,5%.

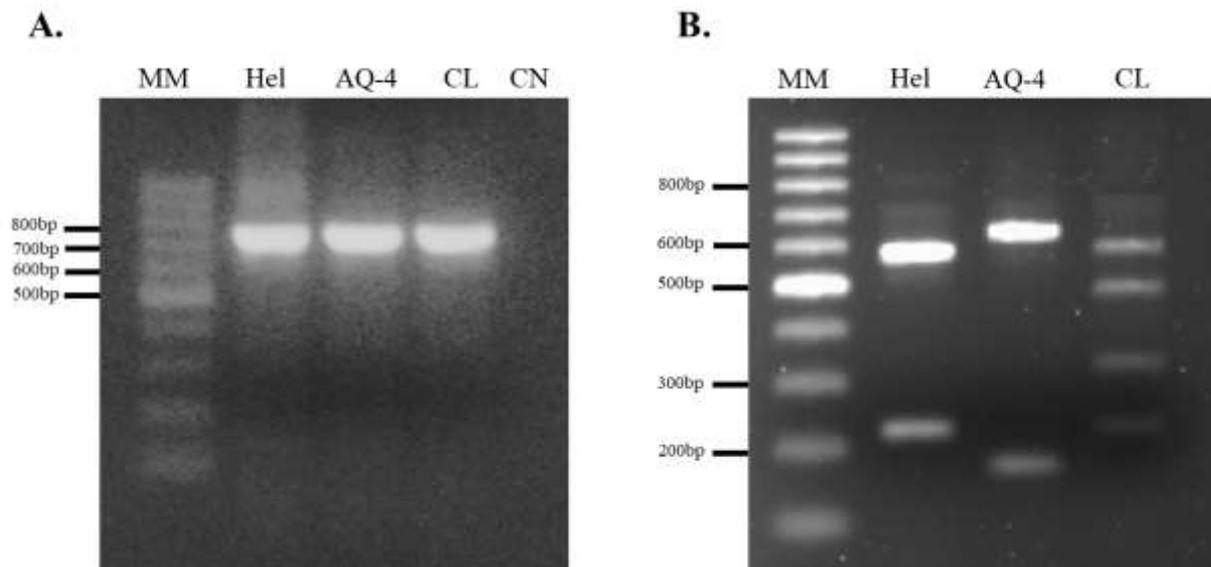


MM: Marcador de peso molecular de 100bp; Hel: Amostra da cultura axênica em meio LIT da cepa Hel de *T. cruzi*; AQ-4: amostra da cultura axênica em meio LIT da cepa AQ-4 de *T. cruzi*; Cas4: amostra da cepa Cas4 de *T. rangeli*. CN: Controle negativo.

A determinação do grupo da DTU também foi realizada pela amplificação do gene da TcSC5D (fragmento de 832bp) (FIG. 12.A) e em seguida digestão pelas enzimas *HpaI* e *SphI* do DNA genômico extraído das culturas axênicas em meio LIT das cepas AQ-4 e Hel. A amostra da cultura da cepa Hel resultou em dois fragmentos de 231 e 601bp, o que caracteriza esta cepa como pertencente ao grupo TcII. Já o DNA genômico extraído da cultura da cepa AQ-4 após a digestão gerou dois fragmentos de tamanhos 177 e 655bp, determinando esta cepa

como TcI. Uma amostra de DNA genômico da cepa CL Brener de *T. cruzi* previamente caracterizada como do grupo TcVI, foi utilizada como controle positivo da ação da *HpaI* e *SphI*, pois neste grupo devido a heterozididade no fragmento de 832bp que após digestão gera fragmentos de 231, 337, 495 e 601bp, conforme figura 12.B.

Figura 12 – Produtos da amplificação do gene TcSC5D e da digestão pelas enzimas *SpaI* e *SphI* do DNA genômico extraído das culturas axênicas em meio LIT das cepas Hel e AQ-4 para determinação de DTU.



**A.** Amplificação do gene TcSC5D do DNA genômico extraído das culturas axênicas em meio LIT das cepas Hel e AQ-4 de *T. cruzi*. MM: marcador de peso molecular de 100bp; Hel: amostra da cultura da cepa Hel; AQ-4: amostra da cultura da cepa AQ-4; CL: amostra da cepa CL Brener. **B.** Resultado da digestão das enzimas *SpaI* e *SphI* dos produtos da amplificação do gene TcSC5D. MM: marcador de peso molecular de 100bp; Hel: amostra da cultura da cepa Hel; AQ-4: amostra da cultura da cepa AQ-4; CL: amostra da cepa CL Brener (TcVI) como controle positivo da ação das enzimas.

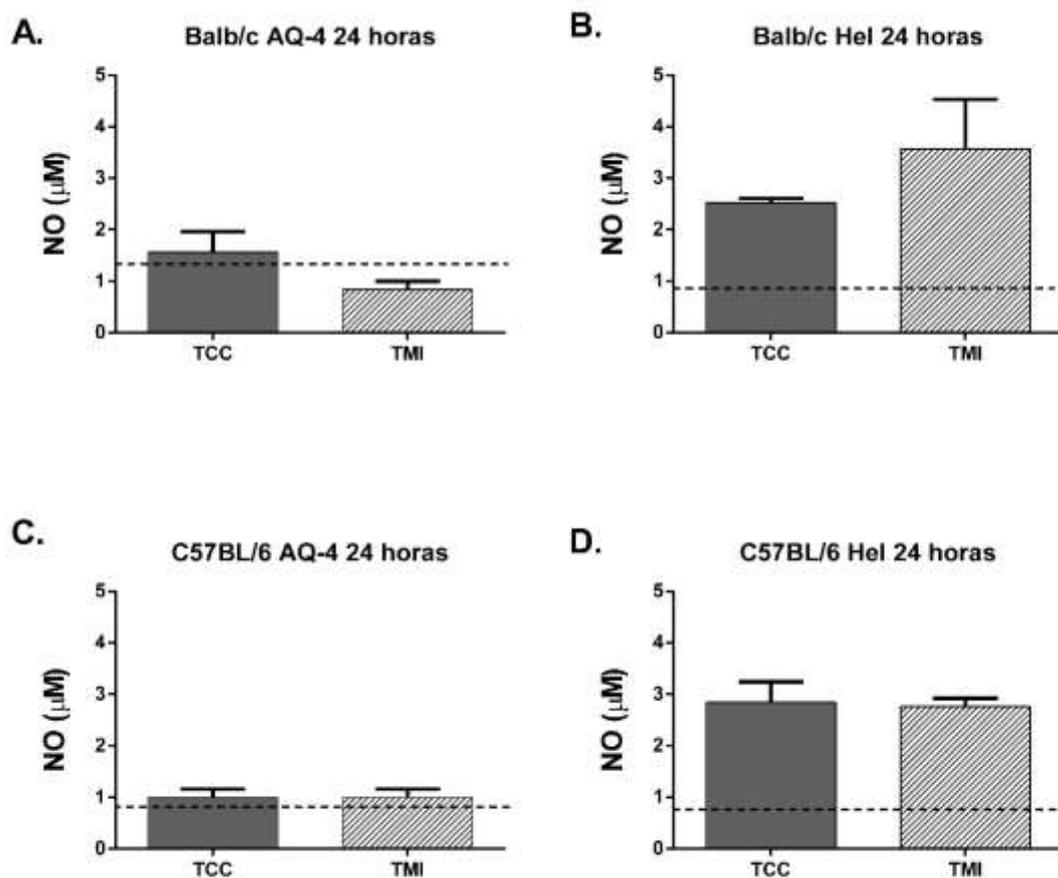
## 5.2. Quantificação da produção de NO

Após a infecção das culturas de macrófagos peritoneais com tripomastigotas de *T. cruzi* das cepas Hel e AQ-4, foram feitas as quantificações das produções de NO em todas as condições de cultivo com 4 horas e 24 horas de infecção (FIG.13). Não foram observados níveis detectáveis de NO em nenhuma condição de cultivo (macrófagos isolados de Balb/c ou C57BL/6) após 4 horas de incubação com ambas as cepas de *T. cruzi*. Ao analisar os níveis de produção de NO em relação ao *background* genético dos macrófagos após 24 horas, observa-

se que os isolados dos camundongos C57BL/6 produziram cerca de 297% a mais que a condição basal, enquanto que nos macrófagos de Balb/c foram de 235% a mais.

Em relação as cepas do parasito, nota-se a cepa Hel foi mais indutora, cerca de 323% a mais que a AQ-4 em ambos isolados de macrófagos. Quando comparadas as formas evolutivas TCC e TMI da cepa AQ-4, observa-se que não houve diferença nos níveis de produção nos macrófagos de C57bl/6, ambas induziram cerca 132% a mais que o estado basal. Já para os macrófagos de Balb/c as formas TCC foram mais indutoras (118% a mais que o basal) que as TMI, que tiveram níveis com 42% inferiores ao estado basal. No entanto, as formas TMI da cepa Hel tiveram níveis detectáveis mais elevados (429% a mais que o basal) que as formas TCC (300%) quando comparadas nos os macrófagos isolados de Balb/c, e níveis iguais nas infecções com macrófagos dos camundongos C57BL/6.

Figura 13 – Quantificação da produção de Óxido Nítrico nas culturas de macrófagos peritoneais isolados dos camundongos C57BL/6 e Balb/c infectados com tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



TCC: tripomastigotas de cultura celular; TMI: tripomastigotas metacíclicas infectantes. A linha tracejada indica os níveis de produção de NO na condição das culturas de macrófagos sem a presença do parasito.

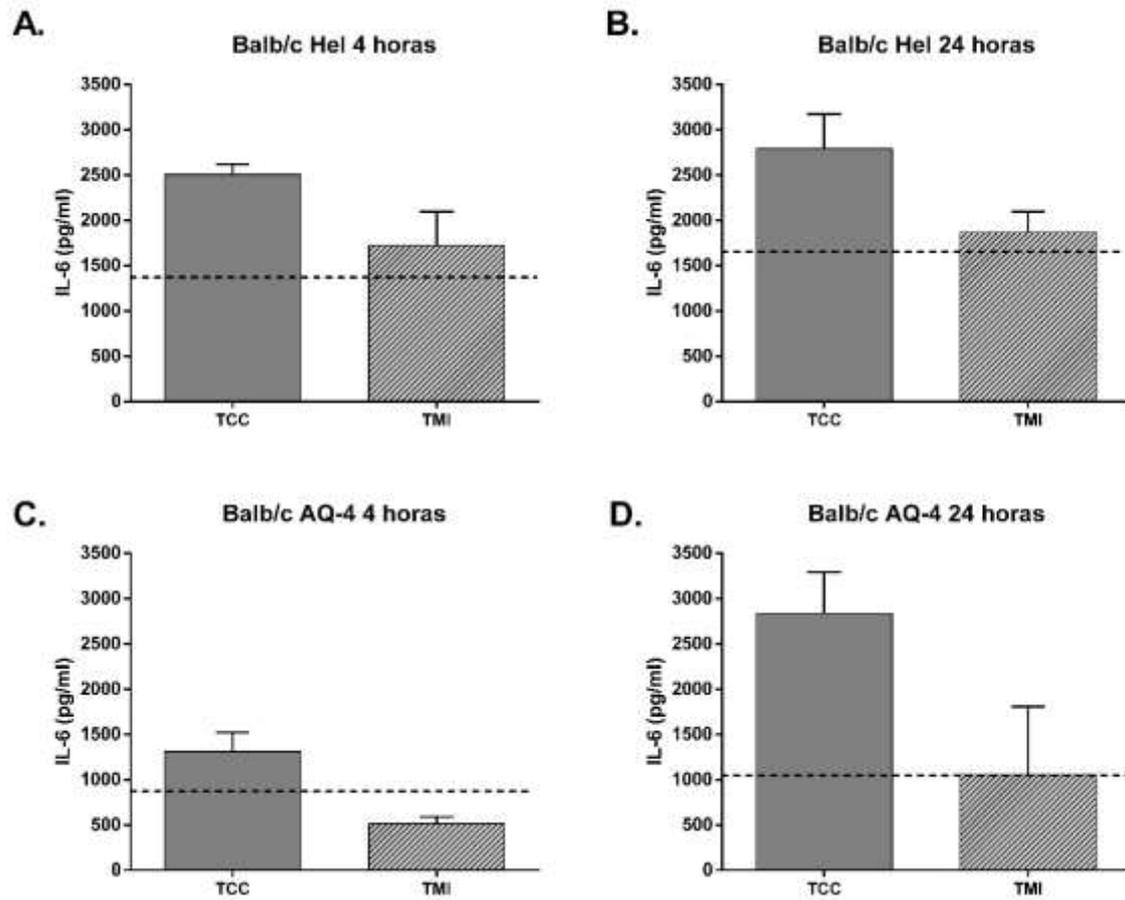
### 5.3. Quantificação da produção de IL-6

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos isolados dos camundongos C57BL/6 e Balb/c infectados com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Hel e AQ-4, foram utilizados para quantificar a produção da IL-6, conforme figuras 14 e 15. Os macrófagos com *background* genético da linhagem de camundongos Balb/c induziram uma produção de IL-6 superior ao basal (em média de 112%), tanto com 4 e 24 horas de infecção, quando comparado com os macrófagos dos camundongos C57BL/6 (em média de 72% a mais).

Em relação as cepas de *T. cruzi*, na Hel observou uma produção maior da IL-6 quando comparada ao basal (138% a mais no Balb/c e 136% no C57BL/6), do que na cepa AQ-4 (87% no Balb/c e 123% a mais no C57BL/6).

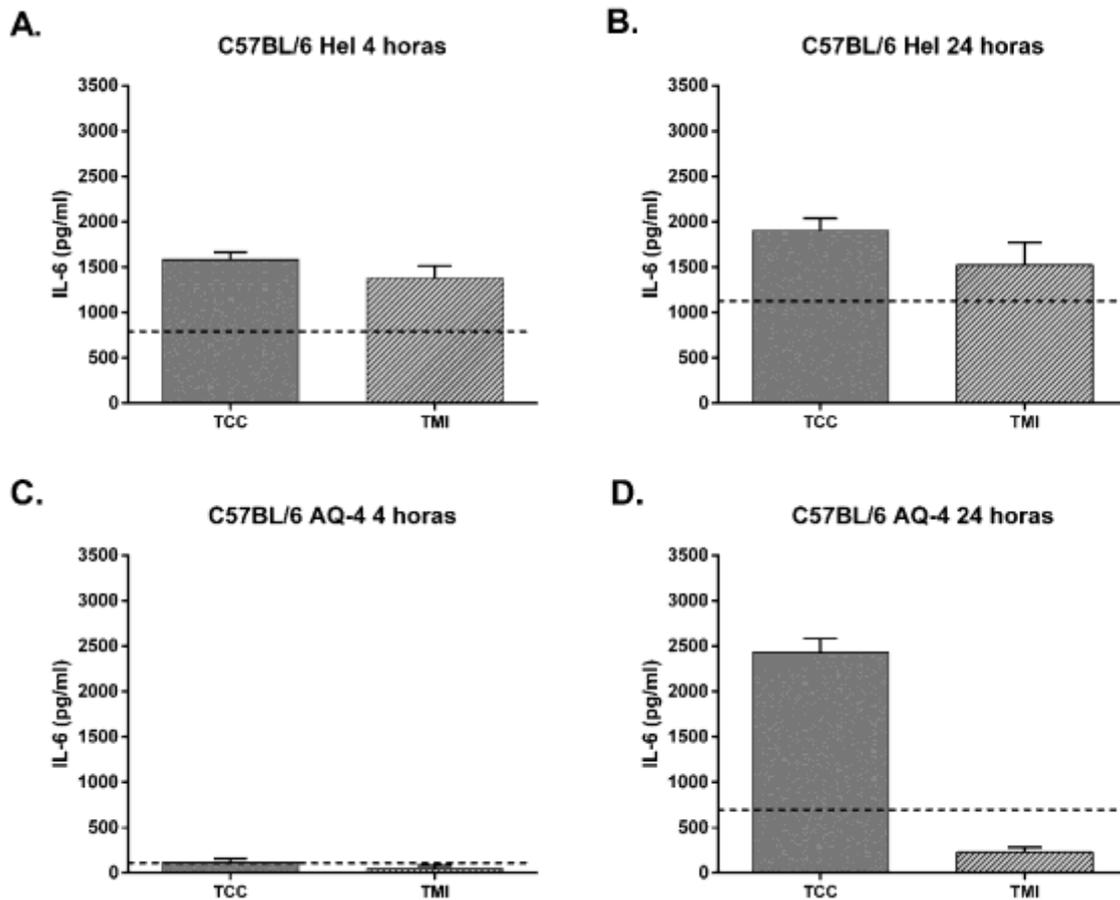
As formas TCC das duas cepas mostraram uma produção maior da citocina em 4 e 24 horas, em relação ao basal (em média de 194% a mais), quando comparadas com as formas TMI (20%), independentemente do *background* genético dos macrófagos e das cepas de *T. cruzi*.

Figura 14 – Quantificação da produção da citocina IL-6 nas culturas de macrófagos peritoneais isolados dos camundongos Balb/c infectados com tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



TCC: tripomastigotas de cultura celular; TMI: tripomastigotas metacíclicas infectantes. A linha tracejada indica os níveis de produção de IL-6 na condição das culturas de macrófagos sem a presença do parasito.

Figura 15 – Quantificação da produção da citocina IL-6 nas culturas de macrófagos peritoneais isolados dos camundongos C57BL/6 infectados com tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



TCC: tripomastigotas de cultura celular; TMI: tripomastigotas metacíclicas infectantes. A linha tracejada indica os níveis de produção de IL-6 na condição das culturas de macrófagos sem a presença do parasito.

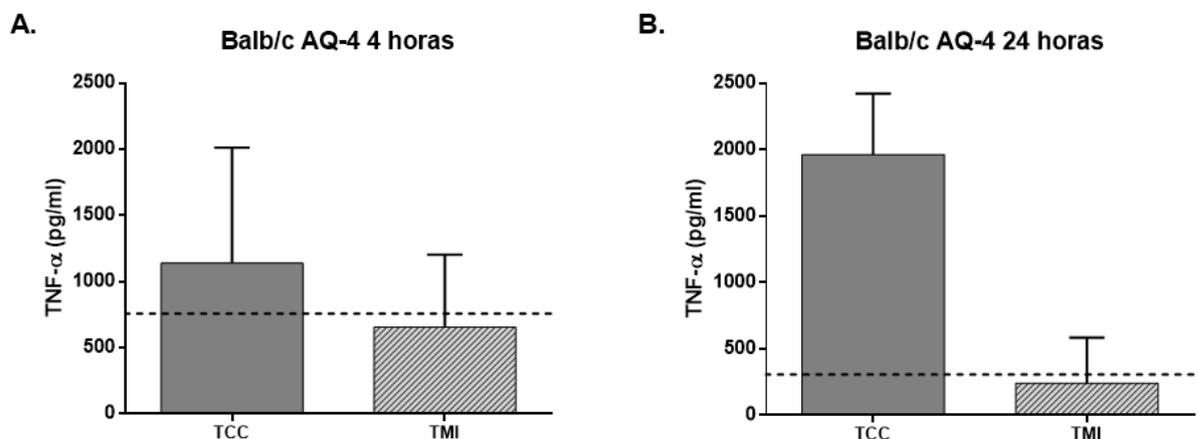
#### 5.4. Quantificação da produção de TNF- $\alpha$

Assim como foi para a IL-6, também foram dosados os níveis de TNF- $\alpha$  nas culturas de macrófagos infectados com *T. cruzi* da cepa Hel e AQ-4 (FIG.16). Os resultados demonstraram que houve níveis detectáveis apenas nos macrófagos isolados dos camundongos Balb/c. Ao correlacionar as cepas do parasito, observou que a cepa Hel não teve níveis detectáveis em nenhum isolado de macrófagos. Já a cepa AQ-4 apresentou níveis detectáveis nos macrófagos Balb/c com aumento considerável ao comparar os tempos de infecção de 4 e 24 horas, em média de 18% e 254%, respectivamente, a mais que os níveis basais.

Em relação as formas evolutivas que possuem a capacidade de infectar hospedeiro vertebrado, nas formas TCC observou níveis mais elevados do TNF- $\alpha$  (cerca de 393% a mais)

quando comparadas com as formas TMI, que tiveram níveis inferiores ao encontrado nas condições basais (aproximadamente 21% a menos). Curiosamente, outro ponto que destaca é o aumento considerável desta citocina com o passar do tempo de infecção, onde foi visto que com 4 horas as formas TCC de AQ-4 induziram uma produção média de 1138,9pg/mL e com 24 horas passou para o valor médio de 1962,32pg/mL

Figura 16 – Quantificação da produção da citocina TNF- $\alpha$  nas culturas de macrófagos peritoneais isolados dos camundongos C57BL/6 e Balb/c infectados com tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



TCC: tripomastigotas de cultura celular; TMI: tripomastigotas metacíclicas infectantes. A linha tracejada indica os níveis de produção de TNF- $\alpha$  na condição das culturas de macrófagos sem a presença do parasito.

### 5.5. Quantificação da produção de IL-10

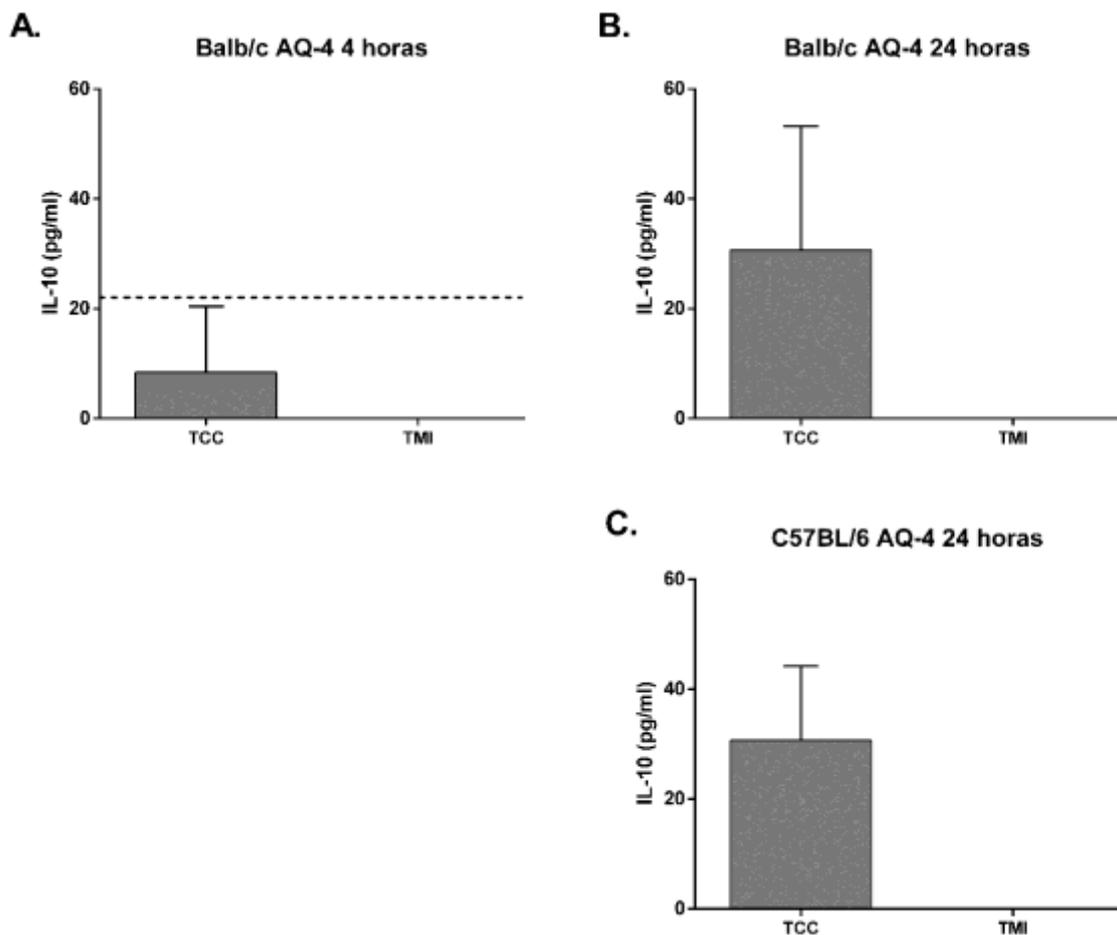
Os níveis da produção de IL-10 foram dosados a partir dos sobrenadantes das culturas de macrófagos isolados dos camundongos C57BL/6 e Balb/c infectados com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Hel e AQ-4 (FIG. 17). Ao analisar os resultados obtidos, notou que não houve diferença entre os *backgrounds* genéticos dos macrófagos após 24 horas de infecção. Entretanto, com 4 horas de infecção nos macrófagos de Balb/c foram observados níveis inferiores as condições basais (263% a menos), enquanto que nos macrófagos de C57BL/6 não foi detectado.

Em relação as cepas de *T. cruzi*, na infecção pela cepa Hel não foi detectável níveis de produção da IL-10, já na cepa AQ-4 em ambos isolados de macrófagos foram detectáveis níveis

de IL-10, principalmente com 24 horas de infecção onde foi encontrado produção de 30,67pg/mL, enquanto que as condições basais não foram teve níveis detectáveis.

Quando comparadas as formas evolutivas do parasito, somente nas infecções com as TCC foram detectados níveis de produção de IL-10 em ambas as cepas e nos dois *backgrounds* genéticos dos macrófagos. A produção foi mais significativa com 24 horas de infecção ao comparar esses níveis com a condição basal de cultivo.

Figura 17 – Quantificação da produção da citocina IL-10 nas culturas de macrófagos peritoneais isolados dos camundongos C57BL/6 e Balb/c infectados com tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



TCC: tripomastigotas de cultura celular; TMI: tripomastigotas metacíclicas infectantes. A linha tracejada indica os níveis de produção de IL-10 na condição das culturas de macrófagos sem a presença do parasito.

## *5. Discussão*

---

## 5. Discussão

Na doença de Chagas as manifestações clínicas são decorrentes do perfil da resposta imune do montada frente ao *T. cruzi*. Os mecanismos da resposta imune são dinâmicos e envolvem múltiplos fatores, como a diversidade genética do parasito, a expressão de proteínas relacionadas a evasão à esta resposta imune, condições clínicas predispostas pelo hospedeiro e perfil de resposta montada. Neste trabalho demonstramos a influência do *background* genético de macrófagos isolados de linhagens distintas de camundongos, que possuem perfis de respostas diferentes, durante o curso da infecção por *T. cruzi* em diferentes cepas e DTUs e formas infectivas (metacíclicas e procíclicas). Observamos que os macrófagos de origem do Balb/c foram mais produtores de IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ , os isolados do C57BL/6 produziram mais NO e não foi detectado a produção de IL-10 e TNF- $\alpha$ . De forma geral, as TCC são mais indutoras de citocinas e de NO do que as TMI e, a cepa AQ-4 resulta em níveis mais elevados de IL-10 e TNF- $\alpha$ , enquanto que a cepa Hel foi de NO e IL-6, em ambos os macrófagos.

Os estudos que utilizam culturas de *T. cruzi* devem garantir que não há a presença de outro parasito, principalmente *T. rangeli*, pois morfologicamente esses dois parasitos são idênticos, e por terem em comum os hospedeiros vertebrados e como vetor o triatomíneo, existe a possibilidade de uma infecção mista, alterando os resultados encontrados. Apesar disto, ambos interagem de formas diferentes em seus hospedeiros (Guarneri e Lorenzo, 2017). É sabido que o *T. rangeli* é patogênico para o triatomíneo, mas, não para o hospedeiro vertebrado (Garneri e Lorenzo, 2017; Vieira et al., 2015; Consentino-Gomes et al., 2014). Muito se tem estudado para compreender essa diferença entre esses dois parasitos. A confirmação feita neste estudo fidedigna os resultados encontrados, permitindo uma avaliação de uma infecção de apenas por *T. cruzi*, pois em estudos que avaliaram uma infecção mista notou que o perfil de resposta imune é diferente (Marini et al., 2011; Basso et al., 2014).

O *T. cruzi* é classificado em seis grupos, chamados de DTUs (TcI-TcVI). Além da similaridade genética, as populações pertencentes a esses grupos possuem outras semelhanças, como a distribuição geográfica e o ciclo de transmissão que estão envolvidas. É observado que esses grupos também são similares nas manifestações clínicas nos seres humanos. (Zingales et al., 2009; 2012). Desta forma, a caracterização feita neste estudo colaborou com essas características de cada grupo, principalmente em relação a resposta imune, que está diretamente interligada as manifestações clínicas, além da distribuição geográfica. Neste estudo foi empregado a técnica de caracterização pela PCR-RFLP que teve como alvo o gene TcSC5D e

em seguida digestão pelas enzimas *SphI* e *HpaI*, confirmando ser um método aplicável para este tipo de diferenciação.

A cepa Hel, que foi isolada de um paciente no estado de Minas Gerais, teve confirmação em sua caracterização como pertencente ao TcII, e estes dados corroboram com a distribuição geográfica proposta por Zingales e cols em 2009, em que as populações de TcII estariam mais presentes na região da América do Sul, principalmente na região central do Brasil, englobando o estado de onde essa cepa foi isolada. Já a cepa AQ-4 de *T. cruzi* após a confirmação pela PCR-RFLP, foi confirmada como pertencente ao grupo TcI, e por ser uma cepa isolada de um triatomíneo no estado da Bahia, também corrobora com a proposta de distribuição geográfica apresentado por Zingales e cols. em 2009, onde a TcI estaria presente em toda a América Central, Sul dos Estados Unidos e na América do Sul, sendo que nas regiões norte e nordeste do Brasil o ciclo mais comum é o silvestre.

As citocinas desempenham um papel fundamental na mediação da interação entre macrófagos, linfócitos T e outras células do sistema imunológico, com o objetivo de desenvolver uma resposta imune para controlar a progressão da doença ou manter um equilíbrio dessa resposta. E os macrófagos são elementos fundamentais nesta resposta, pois, estes podem ser ativados por duas vias, a clássica e a alternativa, dando origem a duas populações distintas, M1 e M2, respectivamente. Essas populações de macrófagos desenvolvem perfis de respostas diferente, a M1 gera resposta do tipo Th1 e M2 resposta Th2. A resposta do tipo Th2 na infecção pelo *T. cruzi* está envolvida no mecanismo de produção de citocinas anti-inflamatórias, IL-10 e TGF- $\beta$ , principalmente. Já a resposta do tipo Th1 tem efeito protetor, produzindo uma resposta anti-*T. cruzi* (TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ ) (Tarleton, 2000). Neste trabalho avaliamos duas populações de macrófagos distintas, que mostradas pela literatura possuem perfis de resposta Th1 (macrófagos de camundongo C57BL/6) e Th2 (Balb/c) frente a infecção por *T. cruzi*. Observamos que o *background* genético do hospedeiro corrobora para a manutenção da resposta imune no curso da infecção, em que os macrófagos de Balb/c foram mais produtores de IL-10, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Enquanto que os de C57BL/6 tiveram maiores níveis de NO e IL-6, apesar de ter sido inferior ao do Balb/c, e não foi detectado IL-10 e TNF-  $\alpha$ .

Os resultados das infecções dos macrófagos isolados dos camundongos mostraram que a linhagem do C57BL/6 produziu, em média, mais NO do que a Balb/c em relação as condições basais. Este resultado corrobora em mostrar que a linhagem de camundongo C57BL/6 possui resposta mais do perfil pro-inflamatório. Estudos em que também utilizaram essa linhagem como modelo experimental corroboram com os nossos resultados, mostrando que esses animais

foram altos indutores de NO (Roggero et al., 2002; Pérez et al., 2005). A cepa AQ-4, que pertence ao grupo TcI, mostrou ser baixa indutora de NO, independentemente do *background* genético dos macrófagos. Um estudo realizado por Koo e colaboradores (2016) em que utilizaram cepas pertencentes a TcI, também evidenciaram esses níveis iniciais baixos de NO. Esses estudos corroboram com os nossos resultados sugerindo que possivelmente cepas pertencentes a TcI tendem a induzir pouco NO, o que acarreta em um aspecto positivo para o parasito, pois não é eliminado pela ação dessa molécula e, pode estar utilizando deste nível baixo como um sinal para proliferar, como foi mostrado por Goes e colaboradores em 2016. Estes níveis baixos também são benéficos para o hospedeiro, visto que a produção excessiva resulta em um estresse oxidativo que causa potenciais danos nos tecidos (Gutierrez et al., 2009). Estudos futuros devem ser feitos com mais representantes deste grupo para determinar esse perfil de resposta. Já a cepa Hel, que pertence ao grupo TcII, nossos resultados demonstram que esta cepa induziu a produção de maior que a AQ-4 em ambos os perfis de macrófagos. Esses resultados sugerem que esta cepa induz uma produção de NO, mesmo que em níveis baixos ao se comparar com outros estudos que utilizaram populações também do grupo TcII (Vespa et al., 1994; Silva et al., 1995).

O NO é fundamental para controle do parasito, visto que, este é o principal mecanismo de combate a forma intracelular (Camargo et al., 1997). Os níveis baixos de NO, comparado com os outros estudos (Koo et al., 2016; Vespa et al., 1994; Silva et al., 1995), pode sugerir uma predisposição desses macrófagos a serem susceptíveis a infecção por ambas as cepas de *T. cruzi*, entretanto, há a necessidade de avaliar mais citocinas envolvidas na ativação de macrófagos. Estudos mostram que para uma produção elevada de NO teria a necessidade da ativação de mais macrófagos por ação da IFN- $\gamma$  e desta forma produzir uma resposta anti-*T. cruzi* (Koo et al., 2016; Silva et al., 1995; Metz et al., 1993). Os níveis baixos de NO também podem sugerir que o parasito induziu uma quantidade suficiente para sobreviver, pois, Goes e colaboradores em 2016 mostraram que ao reduzir significativamente os níveis de NO, o parasito teve sua taxa de multiplicação e proliferação afetada, além de demonstrarem que o parasito utiliza de níveis mínimos dessas moléculas como sinal de replicação e a produção exacerbada seria prejudicial ao parasito. Esses dados corroboram com nossos dados sugerindo que esses níveis baixos de NO seriam o suficiente como sinal de replicação, sem provocar a morte do parasito.

Ao avaliarmos os níveis de produções de IL-6, notamos que os macrófagos isolados dos camundongos Balb/c tiveram níveis mais altos que os macrófagos de C57BL/6, em relação as

condições basais. Este resultado foi contraditório aos resultados encontrados na literatura, pois, foi visto que nesse *background* genético a produção de IL-6 é baixa, visto ser uma citocina pró-inflamatória. Entretanto, esses valores altos de IL-6 podem estar relacionados aos valores baixos de NO nesses mesmos macrófagos. Pois, pode-se sugerir que a IL-6 esteja mediando de forma negativa a produção de NO, ou seja, de modo a um mecanismo anti-inflamatório. Sanmarco e cols. (2017) corroboram com essa hipótese ao demonstrar que camundongos deficientes a produção de IL-6 infectados com *T. cruzi* apresentam um alto nível de NO sérico e demonstrou que a IL-6 atua inibindo indiretamente o NO. Sanmarco e colaboradores (2017) demonstraram que a IL-6 induziu a expressão *in vivo* e *in vitro* da enzima metabólica de ATP CD39 em macrófagos, sugerindo que ela poderia promover uma mudança de um ambiente pró-inflamatório impulsionado por ATP para um meio anti-inflamatório induzido pela adenosina. A adenosina afeta a função dos macrófagos através de vários mecanismos diversos, principalmente em macrófagos a adotar o fenótipo M2. Desta forma, camundongos *knockout* para IL-6 apresentaram altos níveis de NO séricos (Sanmarco et al., 2017).

Em relação ao TNF- $\alpha$  não foram detectados níveis de produção nos macrófagos isolados dos camundongos C57BL/6. Este resultado pode sugerir que esta citocina foi utilizada em uma retroalimentação pelos macrófagos, afim de ativá-los, pois, observou um aumento na produção de NO nesses macrófagos, o que indica uma ativação destas células e estímulo para produzirem NO, uma vez que não havia a presença de outros estimuladores, como o IFN- $\gamma$ . (Camargo et al., 1997;) Entretanto, nos macrófagos isolados do Balb/c houve produção de TNF- $\alpha$ , mas pode-se sugerir que esta molécula não teve efeito na indução a uma produção significativa de NO, pois os níveis de produção dessas moléculas nos macrófagos de Balb foi relativamente baixos.

A presença da IL-10 produzida por esses macrófagos também pode estar relacionada a esses níveis baixos de NO e a não detecção de níveis de TNF- $\alpha$ , pois, sabe-se que esta interleucina tem ação anti-inflamatória reduzindo os níveis das citocinas pró-inflamatórias. Os níveis elevados dessas citocinas também estão relacionadas a ação de outras citocinas produzidas por outras células que compõem a resposta imune inata, como o IFN- $\gamma$ , que é produzido pelas células NK e ativam os macrófagos, e assim aumentando a produção de NO e TNF- $\alpha$  (Tarleton, 2000; Junqueira et al., 2010) Alguns trabalhos mostraram esta interação entre o IFN- $\gamma$ , NO e o TNF- $\alpha$ , em que na presença dessa citocina os níveis das citocinas pró-inflamatórias aumentaram consideravelmente (Silva et al., 1995; ).

Os resultados encontrados da produção da IL-6 associados com a produção de TNF- $\alpha$ , podem sugerir que cepas do grupo TcI, possivelmente, induzem a uma resposta imune pró-

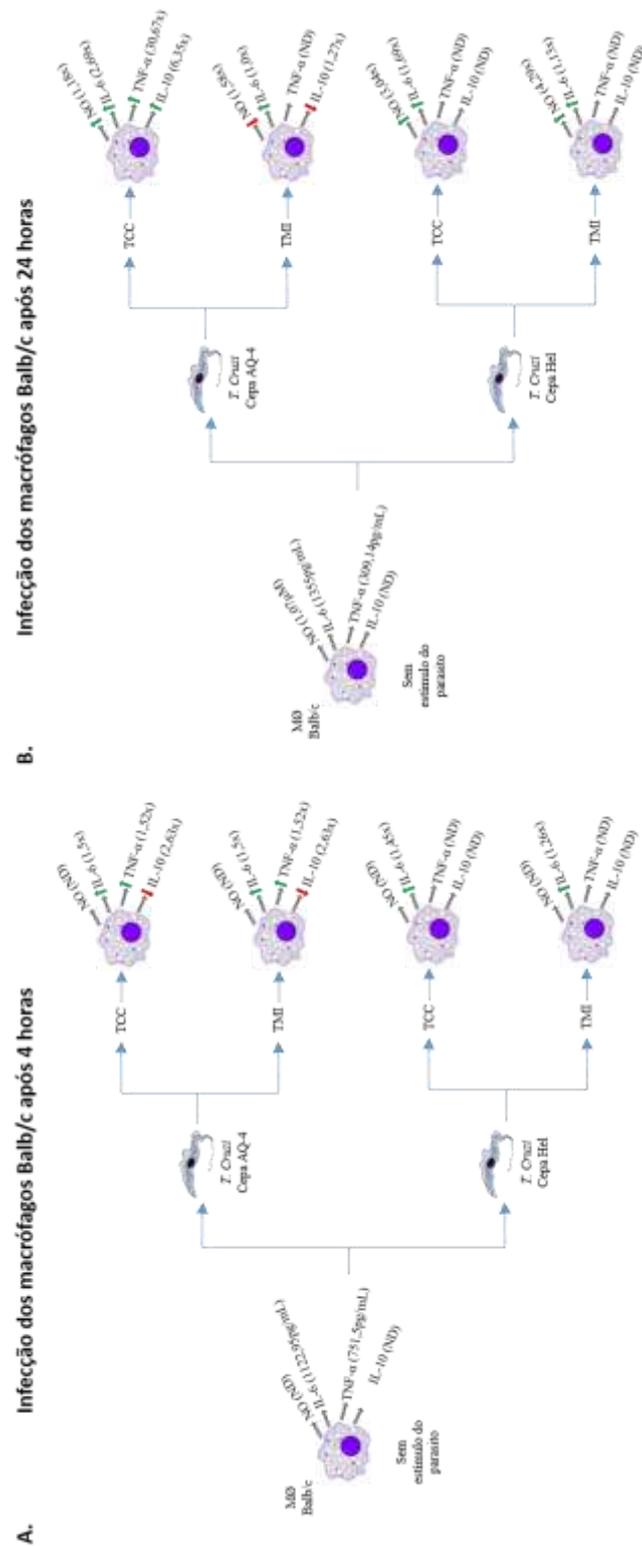
inflamatória. Todavia, estudos para determinar o padrão de resposta de cada grupo de DTU devem ser desenvolvidos, visto que, essas DTUs também são distintas em relação a manifestações clínicas e a resposta imune este diretamente relacionada com essas manifestações (Ripoll et al., 2017).

Em ambos *backgrounds* genéticos dos macrófagos foi detectado a produção de IL-10 em níveis semelhantes entre eles, entretanto, essa produção foi vista somente na infecção pela cepa AQ-4, pode sugerir ser uma cepa indutora de citocinas anti-inflamatórias. A citocina IL-10, que é uma mediadora anti-inflamatória. Estudos mostram que a presença da IL-10 pode estar relacionada a uma maior suscetibilidade a infecção, pois a IL-10 modula as respostas pró-inflamatórias, e conseqüentemente, há aumento na proliferação do parasito e dos danos teciduais (Reed, 1994; Rovsepian et al., 2013).

As tripomastigotas metacíclicas ou as tripomastigotas sanguíneas são basicamente semelhantes em relação parasito-hospedeiro, o que difere umas das outras são os perfis de glicoproteínas expressas em suas membranas. Neste estudo notamos que as formas TCC, que são equivalentes as tripomastigotas sanguíneas, são mais indutoras de citocinas pró-inflamatórias no início da infecção do que as TMI. Um estudo realizado por Vieira e cols. 2012, em que o perfil de resposta imune foi avaliado em infecções feitas com as duas formas, corrobora com os nossos resultados. As formas sanguíneas resultaram em uma indução elevada de citocinas pró-inflamatórias no início da infecção, principalmente TNF- $\alpha$ . Já as metacíclicas tiveram uma expressão inicial de IL-10, que controlou a resposta inflamatória, e com o progresso da infecção aumento as citocinas pró-inflamatórias (Vieira et al., 2012).

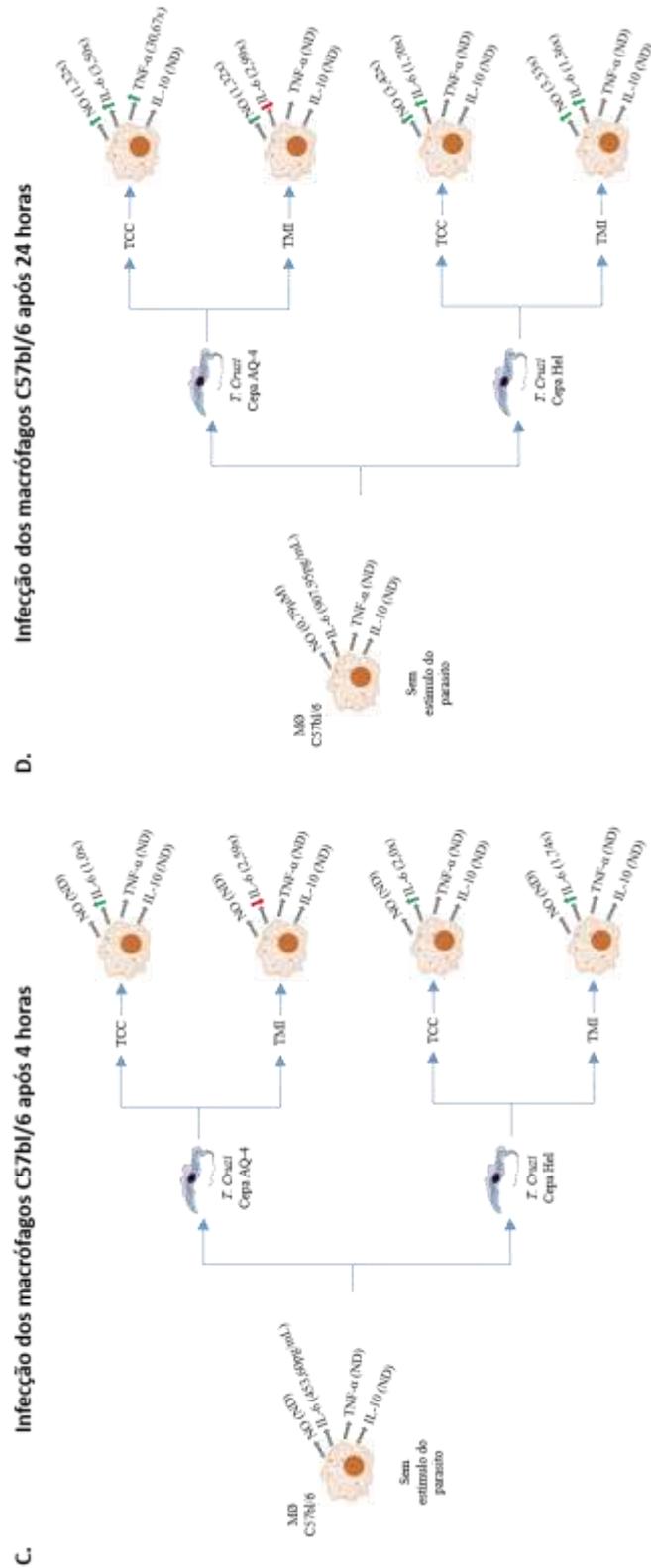
As figuras 18 e 19 retratam todas as condições das produções de NO e das citocinas nos macrófago isolados de Balb,c e C57BL/6 encontradas neste trabalho, evidenciando as diferenças com os níveis encontrados no estado basal dos macrófagos.

Figura 18 - Esquema da produção das citocinas IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de Balb/c e após infecção pelas cepas AQ-4 e Hel de *Trypanosoma cruzi*.



TCC: tripomastigotas de cultura celular; TMI: tripomastigotas metacíclicas infectantes; MØ: macrófago; ND: níveis não detectados; Seta verde: produção maior que os níveis basais; seta vermelha: produção menor que os níveis basais.

Figura 19 - Esquema da produção das citocinas IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de C57BL/6 após infecção pelas cepas AQ-4 e Hel de *Trypanosoma cruzi*.



TCC: tripomastigotas de cultura celular; TMI: tripomastigotas metacíclicas infectantes; MØ: macrófago; ND: níveis não detectados; Seta verde: produção maior que os níveis basais; seta vermelha: produção menor que os níveis basais

## *6. Conclusão*

---

## 6. Conclusão

- Os macrófagos isolados dos camundongos da linhagem C57BL/6 induziram uma produção maior de óxido nítrico quando comparado com os macrófagos isolados de camundongos Balb/c.
- A cepa Hel de *T. cruzi* induziu níveis mais elevados que a cepa AQ-4 em ambos *backgrounds* genéticos dos macrófagos. Estas cepas de *T. cruzi* parecem induzir uma quantidade necessária de NO para a sua sobrevivência, uma vez que, o *T. cruzi* utilizada dessa molécula como um sinal de proliferação.
- Quanto as formas evolutivas do parasito que são capazes de infectar o hospedeiro vertebrado, as formas TCC apresentaram níveis mais elevados de NO do que as formas TMI nos macrófagos isolados de Balb/c.
- Os macrófagos isolados do Balb/c foram mais indutores da IL-6 que os macrófagos de C57BL/6.
- Ambas as cepas de *T. cruzi* induziram níveis elevados de IL-6, entretanto, a cepa Hel induziu níveis mais altos que a cepa AQ-4. Esta alta produção pode estar relacionada como uma característica de equilíbrio a uma resposta pró-inflamatória, pois a IL-6 poderia estar promovendo uma mudança de um ambiente pró-inflamatório impulsionado por ATP para um meio anti-inflamatório induzido pela adenosina. A adenosina afeta a função dos macrófagos, mas, principalmente fazer que eles adotem o fenótipo M2.
- Na infecção com macrófagos isolados do Balb/c a produção de TNF- $\alpha$  foi detectada, em contrapartida nos macrófagos de C57BL/6 essa citocina não foi evidenciada.
- A produção de TNF-  $\alpha$  foi evidenciada somente na cepa AQ-4 e a forma evolutiva TCC foi a mais indutora.
- A não detecção de produção de TNF- $\alpha$  pode sugerir em uma retroalimentação dos macrófagos para ativá-los e no progresso da infecção aumentarem a produção de NO. E uma produção mais elevada de TNF- $\alpha$  necessita da ativação dos macrófagos por outras citocinas, como a IFN- $\gamma$  e desta forma conseguir responder de forma mais efetiva contra o parasito.
- A produção da IL-10 foi detectada tanto macrófagos Balb/c, quanto nos de C57BL/6 e não foi observado diferença nessa produção. Apenas a cepa AQ-4 estimulou a produção desta citocina, e a forma TCC induziu maiores níveis do que as formas TMI.

- Estudos futuros devem ser realizados visando investigar se esses perfis de resposta imune encontrados neste estudo são característicos das DTUs a que estas cepas pertencem, além de investigar sobre os níveis de NO necessário para a sobrevivência dos parasitos e averiguar se o possível mecanismo anti-inflamatório desencadeado pela IL-6.
- Este estudo nos permitiu compreender um pouco mais sobre o início da resposta imune inata frente a essas duas cepas de *T. cruzi* isoladas no Brasil em dois *backgrounds* genéticos de hospedeiros distintos. É possível sugerir que a cepa AQ-4 e a Hel são indutoras de citocinas pró-inflamatórias na fase inicial da infecção.

## *7. Referências*

---

## 7. Referências

- ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; PIACENZA, L.; RADÍ, R. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. **J. Biol. Chem.**, 286(8):6627–40, 2011.
- ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R.; CHIARI, E.; PENNA, S. D.; MACEDO, A. M. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 100: 163-172, 1999.
- ANDRADE, L.O.; ANDREWS, N.W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. **J. Exp. Med.** 200 (9): 1135-1143, 2004.
- APPELBERG, R. As células fagocíticas. In C. Avevedo. *Biologia Celular e molecular*. Lisboa, **LIDEL**, 491-502, 2005.
- BASSO, B.; MORETTI, E.; FRETES, R. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* induces resistance of guinea pigs to virulent *trypanosoma cruzi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 145(1-2): 119-123, 2014.
- BELLINI, M.F.; SILVESTINO-SOUZA, R.; VARELLA-GARCIA, M.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; SILVA, A.E. Biologic and genetics aspects of Chagas Disease at endemic areas. **J. Exp. Med.**, 2012.
- BRENIÈRE, S.F.; WALECKX, E.; BARNABÉ, C. Over six Thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified Discrete Typing Units (DTUs): attempt at a inventory. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 10(8): e0004792, 2016.
- BRISSE, S.; BERNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **Int. J. Parasitol.**, 30(1): 35-44, 2000.
- CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypansomes in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 6: 93- 100, 1964.
- CAMARGO, M.M.; ANDRADE, A.C.; ALMEIDA, I.C.; TRAVASSOS, L.R.; GAZZINELLI, R.T. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. **J. Immunol.**, 159: 6131- 6139, 1997.
- CAMARGO, R. Interação *Trypanosoma cruzi*-hospedeiro: influência da infecção na via de apresentação de antígenos MHC de classe I. 2014. 92f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- CAMPOS, M. A.; ALMEIDA, I.C.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; VALENTE, E.P.; PROCÓPIO, D.O.; et al. Activation of toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **J. Immunol.**, 167(1): 416–423, 2001.
- CARADONNA, K.L.; BURLEIGH, B.A. Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Adv. Parasit.**, 76, 2011.

- CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* in mice by gammainterferon and interleukin 10: role of NK cells. **Immunity**, 64(1): 128-134, 1996.
- CARDOSO, M.S.; REIS-CUNHA, J.L.; BARTHOLOMEU, D.C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Fron. Immunol.** 6: 659, 2015.
- CARRANZA, J.C.; VALADARES, H.M.; D'AVILA, D.A.; BAPTISTA, R.P.; MORENO, M.; GALVÃO, L.M., et al. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. **Int. J. Parasitol**, 39: 963–973, 2009.
- CHAGAS, C. R. J. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 1: 159-218, 1909.
- CHIURILLO, M.A.; CRISANTE, G.; ROJAS, A.; PERALTA, A.; DIAS, M.; GUEVARA, P.; AÑEZ, N.; RAMÍREZ, J.L. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. **Diagnos. Lab. Immunol.**, 10 (5): 775-779, 2003.
- CONTRERAS, V. T.; SALLES, J.M.; THOMAS, N.; MOREL, C. M.; GOLDENBERG, S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 16: 315-327, 1985.
- CONTRERAS, V.; NAVARRO, M.C.; DE-LIMA, A.R.; DURAN, F.; ARTEAGA, R.; FRANCO, Y. Early and late molecular and morphologic changes that occur during the *in vitro* transformation of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes to amastigotes. **Biol. Res.**, 35(1), 2002.
- COSENTINO, R.O.; AGÜERO, F. A simple strain typing assay for *Trypanosoma cruzi*: discrimination of major evolutionary lineages from a single amplification product. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 6(7): e1777, 2012.
- COSENTINO-GOMES, D.; ROCCO-MACHADO, N.; MEYER-FERNANDES, J.R. *Rhodnius prolixus*: modulation of antioxidant defenses by *Trypanosoma rangeli*. **Exp. Parasitol.**, 145: 118-124, 2014.
- COSTALES, J.; ROWLAND, E.C. A role for protease activity and host-cell permeability during the process of *Trypanosoma cruzi* egress from infected cells. **J. Parasitol.** 93: 1350–1359, 2007.
- COURA, J.R. The main sceneries of Chagas Disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions – A comprehensive review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 110(3): 277-282, 2015.
- CUELLAR, A.; ROJAS, F.; BOLAÑOS, N.; DIEZ, H.; DEL-CARMEN-THOMAS, M.; ROSAS, F.; et al. Natural CD4(p) T-cell responses against *Trypanosoma cruzi* KMP-11 protein in chronic chagasic patients. **Immunol. Cell Biol.**, 87:149–153, 2009.
- CURA, C.I.; LUCERO, R.H.; BISIO, M.; OSHIRO, E.; FORMICHELLI, L.B.; BURGOS, J.M.; et al. *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina. **Parasitology**, 139: 516–521, 2012.

DE-LA-TORRE, E.; GENARO, A.M.; RIBEIRO, M.L.; PAGOTTO, R.; PIGNATARO, O.P.; SALES, M.E. Proliferative actions of muscarinic receptors expressed in macrophages derived from normal and tumor bearing mice. **Biochim Biophys Acta.**: 82-89, 2008.

DE-FREITAS, J.M.; PINTO, L.A.; PIMENTA, J.R.; RODRIGUES, L.B.; GONÇALVES, V.F.; TEIXEIRA, S.M.R. CHIARI, E.; et al. Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, 2(3): e24, 2006.

DEL PUERTO, R.; NISHIZAWA, J.E.; KIKUCHI, M.; IIHOSHI, N.; ROCA, Y.; AVILAS, C.; et al. Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 4: e687, 2010.

DE-SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Pharm.**, 8: 269–285, 2002.

DIAS, E. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 28: 110, 1934.

DOSREIS, G.A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma Cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. **Braz. J. Biol. Res.**, 44(2): 84-90, 2011.

EGIMA, C.M.; BRIONES, M.R.; FREITAS-JÚNIOR, L.H.; SCHENKMAN, R.P.; UEMURA, H.; SCHENKMAN, S. Organization of trans-sialidase genes in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol.**, 77: 115-125, 1996.

EL BOUHDIDI, A.; TRUYENS, C.; RIVERA, M.T.; BAZIN, H.; CARLIER, Y. *Trypanosoma cruzi* infection in mice induces a polyisotypic both hypergammaglobulinemia and parasite-specific response involving high levels of IgG2a and highly avid IgG1 antibodies. **Parasite Immunol**, 16:69-76, 1994.

EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. **Immunity**, 41: 21-35, 2014.

FERNANDEZ, M.C.; CORTEZ, M.; FLANNERY, A.R.; TAM, C.; MORTARA, R.A.; ANDREWS, N.W. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. **J Exp Med.**, 208: 909–921, 2011.

FERREIRA, R.C.; IANNI, B.M.; ABEL, L.C.; BUCK, P.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Increased plasma levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  in asymptomatic/“intermediate” and Chagas Disease cardiomyopathy patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 98(3): 407-411, 2003.

GALIZZI, M.; BUSTAMANTE, J.M.; FANG, J.; MIRANDA, K.; SOARES-MEDEIROS, L.C.; TARLETON, R.L.; DOCAMPO, R. Evidence for the Role of Vacuolar Soluble Pyrophosphatase and Inorganic Polyphosphate in *Trypanosoma cruzi* Persistence. **Molecular microbiology**, 90(4): 10.1111/mmi.12392, 2013.

GEISSMANN, F.; MANZ, M.G.; JUNG, S.; SIEWEKE, M.H.; MERAD, M.; LEY, K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. **Science**, 327 (5966): 656-661, 2010.

GUARNERI, A. A.; LORENZO, M. G. Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. **J. Isen. Physio.**, 97: 66-76, 2017.

GUPTA, S.; WEN, J. J.; GARG, N. J. Oxidative stress in Chagas disease. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, 2009:190354, 2009.

GUTIERREZ, F. R.; MINEO, T.W.; PAVANELLI, W.R.; GUEDES, P.M.; SILVA, J.S. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 104(Suppl 1):236–45, 2009.

HOVSEPIAN, E.; PENAS, F.; SIFFO, S.; MIRKIN, G.A.; GOREN, N.B. IL-10 Inhibits the NF- $\kappa$ B and ERK/MAPK-Mediated Production of Pro-Inflammatory Mediators by Up-Regulation of SOCS-3 in *Trypanosoma Cruzi*-Infected Cardiomyocytes. **PLoS ONE** 8(11): e79445, 2013.

HUYGEN, I.C. Reaction of nitrogen dioxide with Griess type reagents. **Anal Chem.** 42(3): 407-409, 1970.

IDOS, S.C.; KRARUP, A.; SIM, R.B.; INAL, J.M.; RAMIREZ. Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of *Trypanosoma cruzi*, **Mol. Immunol.** 47: 426-437, 2009.

JUNQUEIRA, C.; CAETANO, B.; BARTHOLOMEU, D. C.; MELO, M. B.; ROPERT, C.; RODRIGUES, M. M.; GAZZINELLI, R. T. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, 12, 2010.

KESSLER, R.F.; CONTRERAS, V.T.; MARLIÉRE, N.P.; GUARNERI, A.A.; SILVA, L.H.V.; MAZZAROTTO, G.A.C.A.; et al. Recently differentiated epimastigotes form *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. **Mol. Microb.**, 104(5): 712-736, 2017.

KING, K. Y.; GOODELL, M. A. Direct conversion of skin cell into blood: Alchemy or science. **Molecular Therapy**, 19: 227-228, 2011.

KOLLIEN, A.H; SCHAUB, G.A. The development of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae) in the reduviid bug *Triatoma infestans* (Insecta): Influence of starvation. **J. Euk. Microbiol.** 45: 59-63, 1998.

KOO, S.; CHOWDHURY, I.H.; SZCZESNY, B.; WAN, X.; GARG, N.J. Macrophages promote oxidative metabolism to drive nitric oxide generation in response to *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immunity**, 84(12): 3527-3541, 2016.

LENT, H; WYGODZINSKY, M. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vector of Chagas disease. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** 163: 123-520, 1979.

LI, M.O.; FLAVELL, R.A. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. **Immunity**, 28: 468-476, 2008.

LONGO, D. L. Chagas' Disease. **The New Engl J Med**, 373: 456-466, 2015.

MARCILI, A.; VALENTE, V.C.; VALENTE, S.A.; JUNQUEIRA, A.C.; DA-SILVA, F.M.; PINTO, A.Y.; et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: lineages TCI and TCIIa in

wild primates, *Rhodnius spp.* and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **Int. J. Parasitol.** 39: 615–623, 2009.

MARINI, V.; MORETTI, E.; BERMEJO, D.; BASSO, B. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* modulates the profiles of immunoglobulins and IL-6 at local and systemic levels in the early phase of *Trypanosoma cruzi* experimental infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 106(1): 32-47, 2011.

MARQUES, T. Influências dos hospedeiros na produção de anticorpos líticos induzidos por diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* em infecções experimentais. 2017. 131f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Infectologia – Concentração em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2017.

MESQUITA, R.D.; CARNEIRO, A.B.; BAFICA, A.; GAZOS-LOPES, F.; TAKIYA, C.M.; SOUTO-PADRON, T.; et al. *Trypanosoma cruzi* infection is enhanced by vector saliva through immunosuppressant mechanisms mediated by lysophosphatidylcholine. **Infect. Immun.**, 76: 5543–5552, 2008.

MESSENGER, L. A.; MILES, M.A.; BERN, C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, 13(8): 995-1029, 2015.

METZ, G.; CARLIER, Y.; VRAY, B. *Trypanosoma cruzi* upregulates nitric oxide release by IFN- $\gamma$ -preactivated macrophages, limiting cell independently of the respiratory burst. **Parasite Immunology**, 15(12): 693-699, 1993.

MIRON, V. E.; BOYD, A.; ZHAO, J.W.; YUEN, T.J.; RUCKH, J.M.; SHADRACH, J.L.; et al. C2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. **Nat. Neurosci.** 16(9): 1211-1218, 2013.

MONTEIRO, W.M.; MAGALHÃES, L.K.; DE-SÁ, A.R.; GOMES, M.L.; TOLEDO, M.J.; BORGES, L.; et al. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. **PLoS One**, 7, e41284, 2012.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology** 8: 958-969, 2008.

NAGAJYOTHI, F.; MACHADO, F.S.; BURLEIGH, B.A.; JELICKS, L.A.; SCHERER, P.E.; MUKHERJEE, S.; LISANTI, M.P.; et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cell. Microbiol.**, 14(5): 634-643, 2012.

NATHAN, C. Secretory products of macrophages: twenty-five years on. **The Journal of Clinical Investigation**, 10: 1-30, 2014.

NAVARRO, M.C.; DE-LIMA, A.R.; ASKUE, J.; CONTRERAS, V.T. Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastogotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 98(1): 83-91, 2003.

NORRIS, K.A.; BRADT, B.; COOPER, N.R., SO, M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor, **J. Immunol.** 147: 2240-2247, 1991.

- OSORIO, L.; RÍOS, I.; GUTIÉRREZ, B.; GONZÁLEZ, J. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who?. **Microbes and Infection**. 14: 1390-1402, 2012.
- PAIVA, C.N.; FEIJÓ, D.F.; DUTRA, F.F.; CARNEIRO, V.C.; FREITAS, G.B.; ALVES, L.S.; et al. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **The Journal of Clinical Investigation**. 122(7): 2531-2542, 2012.
- PAPATHANASIOU, S.; RICKELT, S.; SORIANO, M.E.; SCHIPS, T.G.; MAIER, H.J.; DAVOS, C.H.; et al. A novel mechanism of cardioprotection through TNF- $\alpha$  induced ectopic expression. Of keratins K8 and K18. **Nat. Med.**, 21(9): 1076-1084, 2015.
- PÉREZ-MOLINA, J.A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4), 2017.
- PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M.N.; MARTÍNEZ, A.; RADI, R. *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. **Antioxid. Redox Signal**, 19(7):723–34, 2013.
- PINTO, A.Y.; VALENTE, S.A.; VALENTE, V.C.; FERREIRA-JUNIOR, A.G.; COURA, J.R. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 41: 602–14, 2008.
- PIXLEY, F. G.; STANLEY, E. R. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. **Trends Cells biology**, 14: 628-638, 2004.
- RADI, R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. **J. Biol. Chem.**, 288(37):26464–72, 2013.
- REED, S.G.; BROWNELL, C.E.; RUSSO, D.M.; SILVA, J.S.; GRABSTEIN, K.H.; MORRISSEY, P.J. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immun.** 153(7): 3135-3140, 1994.
- RIPOLL, J.G.; GIRALDO, N.A.; BOLAÑOS, N.I.; ROA, N.; ROSAS, F.; CUÉLLAR, A.; PUERTA, C.J.; GONZÁLEZ, J.M. T cells responding to *Trypanosoma cruzi* detected by membrane TNF- $\alpha$  and CD154 in chagasic patients. **Immunity, Inflammation and Disease**, doi: 10.1002/iid3.197, 2017.
- RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. The immune response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. **J. Parasitol. Res.**, 2012.
- ROSSI, M.A.; RAMOS, S.G.; BESTETTI, R.B. Chagas' heart disease: clinical-pathological correlation. **Front Biosci**. 8 (1): 94-109, 2003.
- SANMARCO, L.M.; PONCE, N.E.; VISCONTI, L.M.; EBERHARDT, N.; THEUMER, M.G.; MINGUEZ, Á.R.; et al. IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1863: 857-869, 2017.

SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D.M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 104(Suppl. I): 246-251, 2009.

SILVA, J.S.; VESPA, G.N.; CARDOSO, M.A.; ALIBERTI, J.C.; CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infection and Immunity**, 63(12): 4862-4867, 1995.

SPINELLA, S.; LIEGEARD, P.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease. **Exp Parasitol**, 74:6-56, 1992.

TAMBOURGI, D.V.; KIPNIS, T.L.; DA-SILVA, W.D.; JOINER, K.A.; SHER, A.; HEATH, S.; HALL, B.F.; et al. A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. **Infect. Immun.** 61: 3656-3663, 1993.

TARLETON, R. L.; SUN, J.; ZHANG, L.; POSTAN, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. **Infect. Immun.**, 62:1820-1829, 1994.

TARLETON, R.L. Immune System Recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Opin Immunol.**, 19(4): 430-4, 2007.

TARLETON, R.L.; GRUSBY, M.J.; ZHANG, L. Increased susceptibility of Stat4- deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, 165: 1520-1525, 2000.

TIBAYRENC, M. Integrated genetic epidemiology of infectious diseases: the Chagas model. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 93(5): 577-80, 1998.

VALCK, C.; RAMÍREZ, G.; LÓPEZ, N.; RIBEIRO, C.H.; MALDONADO, I.; SÁNCHEZ, G.; et al. Molecular mechanisms involved in the inactivation of the first component of human complement by *Trypanosoma cruzi* calreticulin, **Mol. Immunol.** 47 : 1516-1521, 2010.

VESPA, G.N.R.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infection and Immunity**, 62(11): 5177-5182, 1994.

VIEIRA, P.M.A.; FRANCISCO, A.F.; MACHADO, E.M.M.; NOGUEIRA, N.C.; FONSECA, K.S.; REIS, A.B.; et al. Different infective forms trigger distinct immune response in experimental Chagas Disease. **PLoS One**, 7(3): e32912, 2012.

WALKER, D. M.; OGHUMU, S.; GUPTA, G.; McGWIRE, B.S.; DREW, M.E.; SATOSKAR, A.R. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cell Mol. Life Sci.**, 71(7): 1245-1263, 2014.

WEGNER, D.H.; ROHWEDDER, R.W. The effect of nifurtimox in acute Chagas' infection. **Arzneimittelforschung**, 22: 1624-35, 1972.

WESTENBERGER, S.J.; STURM, N.R.; CAMPBELL, D.A. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. **Int. J. Parasitol.**, 36(3): 337-346, 2006. Epub 2005.

WESTON, D; PATEL, B; VAN-VOORHIS, W.C. Virulence in *Trypanosoma cruzi* infection correlates with the expression of a distinct family of sialidase superfamily genes. **Mol Biochem Parasitol.**, 98: 105–116, 1999.

WHO – World Health Organization (2017) Fact Sheet N°340 – Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en//index.html>. Acesso em 19 de dezembro de 2017.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Na. Acad. Bras. Cienc.**, 78(1): 97-111, 2006.

ZAGO, M.P.; HOSAKOTE, Y.M.; KOO, S.J.; DHIMAN, M.; PIÑEYRO, M.D.; PARODI-TALICE, A.; et al. TcI isolates of *Trypanosoma cruzi* exploit the antioxidant network for enhanced intracellular survival in macrophages and virulence in mice. **Infection and Immunity**, 84(6): 1842-1856, 2016.

ZHANG, L.; TARLETON, R.L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **J. Infect. Dis.**, 180(9): 480-486, 1999.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something know about Chagas Disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Act. Trop.**, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>, 2017.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.; CAMPBELL, D.A.; CHIAR, I.; FERNANDES, O.; et al. A new for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 104(7): 1051-1054, 2009.

ZINGALES, B.; MILES, M.A.; CAMPBELL, D.A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.M.; TEIXEIRA, M.M.; et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, 12: 240-253, 2012.

## *8. Anexos*

---

## Anexo A



Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
 Comissão de Ética no Uso de Animais  
 R. Madre Maria José, n° 122 - Bairro Abadia Uberaba/MG CEP 38025-100  
 (34) 3700-6764

Uberaba, 04 de dezembro de 2017

PARECER N° 1/2017/CEUA/PROPPG  
 PROCESSO N° 23085.003914/2017-91  
 INTERESSADO: WENDELL SERGIO FERREIRA MEIRA  
 Parecer de aprovação da proposta Avaliação do perfil de citocinas produzidas por macrófagos intraperitoneais após infecção com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*  
 ASSUNTO:

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação do perfil de citocinas produzidas por macrófagos intraperitoneais após infecção com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*”, registrada com o n° 23085.003914/2017-91, sob a responsabilidade de Wendell Sérgio Ferreira Meira – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em reunião de 01/12/2017.

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/12/2017 à 10/01/2018
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongos Isogênicos C57Bl/6 Camundongos Isogênicos Balb/C
N° de animais	16 Camundongos Isogênicos C57Bl/6 16 Camundongos Isogênicos Balb/C
Peso/idade	20-25 gramas/ 6-8 semanas
Gênero	Machos
Origem	Biotério central, Instituto Ciências Biomédicas – UFU, Campus Umuarama, Uberlândia – MG

Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues

Coordenador da CEUA



Documento assinado eletronicamente por ALDO ROGELIS AQUILES RODRIGUES, Coordenador(a) da Comissão de Ética no Uso de Animais, em 04/12/2017, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0011061 e o código CRC 0350240C.

Referência: Processo nº 23085.003914/2017-91

SEI nº 0011061