

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

Estudos da Interação *Trypanosoma cruzi*-hospedeiro mamífero enfatizando a resposta imunológica e caracterização biológica da proteína P21 do parasito

Adele Aud Rodrigues

Uberlândia - MG

Fevereiro 2015

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

Estudos da Interação *Trypanosoma cruzi*-hospedeiro mamífero enfatizando a resposta imunológica e caracterização biológica da proteína P21 do parasito

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

Adele Aud Rodrigues

Uberlândia - MG

Fevereiro 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R696e Rodrigues, Adele Aud, 1986-
2015 Estudos da interação *Trypanosoma cruzi* hospedeiro mamífero enfatizando a resposta imunológica e caracterização biológica da proteína P21 do parasito / Adele Aud Rodrigues – 2015.
161p. : il.

Orientador: Claudio Vieira da Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 3. Chagas, Doença de - Teses. 4. Fagocitose – Teses. I. Silva, Claudio Vieira da, 1972. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Dedico este trabalho em especial:

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

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

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

Meus Sinceros Agradecimentos:

A Deus, por permitir que eu estivesse realizando esse trabalho, assim como tudo em minha vida;

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

Novamente à toda minha família,
Meus pais Angela Maria e José Joaquim,
Minha irmã Laura,
Meus irmãos de coração Giovani e Fabiana
Por toda a compreensão e amor que me fornecem

À família LATRI, Flávia, Aline, Ana Flávia, Thaise, Cecílio, Fabrício, Tatiana, Marlus, Paula, Rebecca, Amanda, Núbia, Priscila, Karine, Fabiana, Célio, Bruna, Samuel, João Paulo, Patrícia, Ana Clara, Rosiane. Obrigada por todo auxílio prestado, por todo o carinho gerado, por toda amizade existente. Todos vocês são partes deste trabalho e de mais esta nova etapa de minha vida. Saibam que são extremamente importantes para mim

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

A todo o pessoal do laboratório do Dr. João Santana, principalmente à Grace Kelly da Silva, que foi quem me recebeu, me guiou e auxiliou durante todo o processo, sempre com disponibilidade e paciência; aos técnicos Cristiane Milanezi e Wander C. R. da

Silva, por todo auxílio prestado, ao Júlio A. Siqueira, por auxiliar quanto a manutenção e obtenção dos animais nocautes; por todos os alunos de pós-graduação e iniciação científica do laboratório, em especial Renata, Maria Cláudia, Manuela, Thiago, por todo o auxílio e amizade que proporcionaram.

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

A todo o pessoal do Instituto de Ciências da Vida e da Saúde (ICVS), da Universidade do Minho (Portugal), em especial ao Professor Dr. Fernando Rodrigues, à Professora Dra. Margarida Saraiva, por terem aceitado me receber em seu laboratório e terem me auxiliado com meu trabalho. Ao Dr. Marcus Henricus Johannes Sturme (Mark) por todo o ensinamento proporcionado, a paciência em auxiliar sempre, e aos amigos que lá fiz, João, Jéssica, Júlia, Andréia, pelos ensinamentos e amizade. Nunca me esquecerei dos meses que aí passei.

À todos os amigos brasileiros feitos durante a estadia em Portugal, Cíntia, Fabiana Couto, Fabiana Silva, Rafaela, Susane, Joseana, Adilson, por serem minha família enquanto estava fora de meu país de origem, em especial ao meu amigo Deivid, que se tornou um irmão para mim, e sempre esteve presente durante todos os momentos adiantes, para me auxiliar com seus ensinamentos e amizade;

À técnica Dona Zilda, pela prontidão em nos auxiliar e por ajudar a manter o laboratório mais organizado;

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

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

À Dr. Thaisa Carrijo de Oliveira e aos técnicos do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal por todo o auxílio na manutenção dos animais.

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

Aos amigos externos a faculdade, Gabriela, Claritcha, Monalisa e Júnior, Mary Ellen, Roberta, Luanny (saudades eternas), Marlene... por me fazerem compreender o verdadeiro sentido da amizade;

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

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

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

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
01-INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Considerações Gerais.....	15
1.2 Características gerais de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
1.3 Mecanismos de invasão celular.....	24
1.4 Resposta imunológica contra <i>T. cruzi</i> em modelos animais.....	30
2.0 JUSTIFICATIVA.....	36
3.0 OBJETIVOS GERAIS.....	37
4.0 Artigo 1- IFN- γ plays a unique role in protection against low virulent <i>Trypanosoma cruzi</i> strain.....	38
5.0 Artigo 2- KC expression correlated to <i>Trypanosoma cruzi in situ</i> control upon oral infection.....	48
6.0 Artigo 3- A recombinant protein based on <i>Trypanosoma cruzi</i> P21 enhances phagocytosis.....	78
7.0 DISCUSSÃO.....	88
8.0 CONCLUSÃO.....	114
9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
ANEXO I- Parecer do Comitê de ética em Pesquisa.....	154
ANEXO II- Artigo com o qual colaborei.....	155

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

IL-12	Interleucina-12
IFN- γ	Interferon-gamma
RANTES	<i>“Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted”</i>
MIP-1 β	<i>“macrophage inflammatory protein 1 beta”</i>
MCP-1	<i>“monocyte chemotactic protein-1”</i>
MIP-1 α	<i>“macrophage inflammatory protein 1 alpha”</i>
IL-17	Interleucina-17
TNF- α	<i>“Tumor necrosis factor-alpha”</i>
TLR	<i>“Toll- like receptor”</i>
NO	Óxido nítrico
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
IL-18	Interleucina-18
KO	Nocaute ou <i>“Knockout”</i> ou $-/-$

M	Molar
mL	Militro
μL	Microlitro
ng	Nanograma
IgG	Imunoglobulina G
P21-His ₆	Proteína recombinante de P21 com cauda de seis histidinas
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> - Meio de cultura de células
SFB	Soro Fetal Bovino
LIT	<i>"Liver Infusion Tryptose"</i>
PBS	Solução de salina tamponada com fosfatos
MEF	Fibroblasto embrionário de Murino
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

AE	Amastigotas Extracelulares
PPD	parafenilenodiamina
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
TM	Tripomastigotas metacíclicos

RESUMO

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas. Devido à ampla diversidade genética e fenotípica existente em *T. cruzi*, a espécie foi dividida em seis discretas unidades de tipagem (DTU), denominadas *T. cruzi* I a VI. A cepa G pertence ao grupo *T. cruzi* I e a CL a *T. cruzi* VI. Formas amastigotas extracelulares (AE) são consideradas importantes na manutenção do ciclo no hospedeiro vertebrado. Estudos quanto à diferença de infectividade e caracterização da suscetibilidade imunológica de parasitas pertencentes aos diferentes grupos mostram-se relevantes para que terapias baseadas na resposta imunológica sejam eficientes para todos os grupos filogeneticamente distintos. A proteína P21 de *T. cruzi* foi recentemente caracterizada e sua possível atuação no processo de internalização do parasito na célula hospedeira foi observada. Dar continuidade à caracterização funcional da P21 de *T. cruzi* por meio do emprego de sua forma recombinante (P21-His₆) é de grande relevância, pois esta poderá futuramente figurar entre os potenciais alvos terapêuticos para o tratamento da doença de Chagas. Os objetivos desse trabalho foram analisar o perfil imunológico mediante a infecção por *T. cruzi*, buscando identificar a atuação diferenciada dessa resposta frente a duas cepas (G e CL) e formas distintas do parasito (tripomastigotas metacíclicos ou amastigotas extracelulares); analisar o tropismo diferencial das cepas G e CL de *T. cruzi* durante a infecção aguda e crônica em camundongos; caracterizar a atividade biológica da proteína P21 de *T. cruzi*, buscando analisar sua função para o parasito e atuação na célula hospedeira. No presente trabalho mostra-se que amastigotas extracelulares da cepa G não induzem infecção patente *in vivo* devido a sua alta susceptibilidade à produção de IFN- γ no início da infecção. Houve diferença no tropismo entre as distintas cepas, durante a cinética de infecção, sendo que a cepa CL manteve-se preferencialmente no estômago, tanto na fase aguda quanto crônica, e a cepa G manteve-se no estômago no decorrer de toda a infecção, mas também foi capaz de migrar para o tecido cardíaco, principalmente no processo de cronificação. A quimiocina KC parece exercer um importante papel no controle da infecção, podendo interferir no curso da mesma, assim como na possível migração dos parasitos; a P21-His₆ aumenta a fagocitose e a remodelação do citoesqueleto de actina, ao se ligar no receptor CXCR4 e ativar a via de PI3-k.

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

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of Chagas disease. Due to its genetic diversity, species have been divided into six groups denominated Discrete Typing Units (DTU I to VI). The G strain belongs to *T. cruzi* I group and CL to *T. cruzi* VI. Extracellular amastigotes forms (EA) are considered important in maintaining the vertebrate host cycle. Studies concerning the difference of infectiveness and the characterization of immunologic susceptibility in parasites belonging to different groups are relevant so that therapies based upon immunological response may be efficient for all distinct phylogenetic groups. *T. cruzi*'s P21 protein has recently been characterized and its probable action in parasites internalization process into host cell was observed. To give continuity to the functional characterization of *T. cruzi*'s P21 employing its recombinant form (P21-His₆) is of great relevance taking into account that these could in the future take part into the potential therapeutic goals. The objectives of this study were to analyze the immunological profile by *T. cruzi* infection, seeking to identify the differentiated performance of this response against G and CL strains and different forms of the parasite (metacyclic trypomastigotes or extracellular amastigotes); to analyze the differential tropism of CL and G strains during the acute and chronic infection; characterize the biological activity of P21 *T. cruzi* protein, trying to analyze its function to the parasite and performance in the host cell. We observed that extracellular amastigotes from G strain does not induce patent infection *in vivo* due to their high susceptibility to IFN- γ production early in infection; There were differences in tropism between the different strains, since during the kinetics infection, the CL strain was maintained preferably in the stomach, both in the acute and chronic phase and G strain remained in the stomach throughout the entire infection, but was also able to migrate into the heart tissue, particularly in chronic infection; The chemokine KC seems to play an important role in controlling the infection and may influence the course of infection, as well as the possible migration of parasites; the P21-His₆ enhances phagocytosis and the remodeling of the actin cytoskeleton by binding to CXCR4 receptor and activate via PI3-k.

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

01- INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

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

Estima-se que atualmente 7 a 8 milhões de pessoas encontram-se infectadas em todo o mundo (WHO, 2013). Em 2010, a 63^o *World Health Assembly* (WHA) (DUTRA et al, 2009) salientou a seriedade da doença de Chagas tanto em áreas endêmicas quanto não endêmicas, o que pede por medidas que investiguem melhor a transmissão dessa doença, seu diagnóstico e tratamento. O aumento da ocorrência de Chagas em áreas não endêmicas (principalmente em decorrência das imigrações, transfusão de sangue e transplantação de órgãos), assim como sua ressurgência em países já endêmicos, recentemente tem sido o alvo principal de discussões. Vários programas governamentais de controle da doença de Chagas foram lançados na América Latina, iniciando no ano

de 1960. Dentre esses programas, a Iniciativa do Cone Sul (SCI) foi formalizada em 1991, pelos governos da Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, com o objetivo principal de conter a transmissão da doença eliminando, primariamente, o principal vetor domiciliar (*Triatoma infestans*) (LEON et al, 2004). Na 15^a reunião da Comissão Intergovernamental da Iniciativa do Cone Sul contra a doença de Chagas foi declarada formalmente a interrupção da transmissão desta doença pelo inseto vetor *Triatoma infestans* no Brasil. É importante salientar que *T. cruzi* infecta várias espécies de triatomíneos e possui vários reservatórios animais. A eliminação de uma das espécies pode levar à ocupação por outras espécies de nichos ecológicos vagos (DE SOUZA, 2007). Pode ser citado como exemplo o encontro de *Panstrongylus megistus* infectados em residências situadas na vizinhança do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (LISBOA et al., 2004). Apesar do grande progresso da Iniciativa do Cone Sul, ações de fiscalização não foram mantidas, resultando no ressurgimento do vetor em áreas já consideradas livres do mesmo (ANDRADE, GOLLOB, DUTRA, 2014).

Nos últimos 10 anos, 73 casos de doença de Chagas foram descritos na literatura, contrastando com 41 de 20 anos anteriores (1981–2001). Tal número pode consistir em uma subestimação da realidade devido aos casos não diagnosticados. (NÓBREGA et al, 2009; BASTOS et al, 2010; ANDRADE, GOLLOB, DUTRA, 2014). O aumento no número de pessoas viajando para outros países e a migração de indivíduos de regiões endêmicas para não endêmicas apresenta um cenário preocupante ao aumentar a propensão de infecção congênita, por transfusão sanguínea e transplantação de órgãos. Tem sido estimado que por volta de 300.000 pessoas estejam infectadas com *T. cruzi* nos Estados Unidos (BERN et al, 2011) e, apesar de relativamente limitados, dados epidemiológicos da Europa estimam 59,000–108,000 casos de doença de Chagas, com maiores números na Espanha e Itália. Devido a essa situação, o Reino Unido, França, Espanha e Estados Unidos instituíram a triagem para *T. cruzi* em seus bancos de sangue (ANGHEBEN et al, 2011). Dessa forma, uma doença que tradicionalmente estava contida na América Latina, bem como ao sul dos Estados Unidos, agora cruzou as barreiras geográficas e se tornou não somente um problema de países endêmicos, como também para a comunidade internacional (ANDRADE, GOLLOB, DUTRA, 2014).

O tratamento quimioterápico para Chagas se baseia principalmente em duas drogas: Nifurtimox ou Benznidazol. Ambas as drogas são efetivas apenas no tratamento durante a fase aguda da doença. Entretanto, a eficácia dessas no tratamento da fase

crônica (fase em que a maioria dos indivíduos é diagnosticada) é controverso (BOSCARDIN et al, 2010). Além disso, certos inconvenientes para ambas as drogas já foram relatados, tais como efeitos colaterais tóxicos, e, mais recentemente, a emergência de parasitos resistentes à tais drogas. Tais fatos intensificam a necessidade da busca por novas drogas contra *T. cruzi*. (BOSCARDIN et al, 2010; URBINA, 2010). Pesquisadores tem buscado explorar drogas já existentes, usadas para o tratamento de outras doenças humanas, tais como Alzheimer, para o tratamento de Chagas (DAMASCENO et al, 2014). Paveto e colaboradores (1995) sugeriram que epimastigotas de *T. cruzi* possuem um receptor N-metil-Daspartato (NMDA)-tipo L-glutamato, envolvido no controle de níveis de cálcio citosólico. (PAVETO et al, 2011). Outros trabalhos demonstraram que análogos de amantadina e memantina (1,2,3,5,6,7-hexahidro-1,5:3,7-dimetano-4-benzoxonin-3-il), aminas com atividade antagonista a receptores NMDA, tiveram atividade trypanocida significativa, contra *Trypanosoma brucei* (DUQUE et al, 2010). Tais dados levaram outros pesquisadores a testar antagonistas desses receptores NMDA no tratamento de *T. cruzi*, tais como amantadina e memantina (usadas para o tratamento de Alzheimer) (LIPTON, 2005) e MK-801, que já está sendo testado em estudos pré-clínicos (de BARTOLOMEU et al, 2013). Nesse estudo, observaram que memantina exibiu a maior atividade anti-proliferativa, e um relevante efeito trypanocida. Experimentos mostraram que memantina mobiliza cálcio intracelular e induz processo apoptótico, o que suporta a presença de receptores com atividade similar aos receptores NMDA-glutamato, que podem ser usados como alvos para drogas contra o parasito (DAMASCENO et al, 2014).

1.2 Características Gerais de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi pertence à Ordem Kinetoplastida, atualmente renomeado como Metakinetoplastina (Adl et al, 2012) , Família Trypanosomatidae e caracteriza-se morfológicamente por apresentar três estágios evolutivos distintos: epimastigota, tripomastigota e amastigota. O desenvolvimento de um estágio a outro é um processo complexo, envolvendo mudanças ultraestruturais, antigênicas e fisiológicas (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984).

O ciclo biológico de *T. cruzi* é heteroxênico, envolvendo um hospedeiro vertebrado (mamíferos de várias espécies, incluindo o homem) e um invertebrado (vetor), representado por insetos hemípteros da Família Reduviidae, cujos gêneros de

maior importância são *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (BARRETO, 1979). O início do ciclo pode ocorrer quando o inseto triatomíneo ingere formas tripomastigotas juntamente com o sangue de um hospedeiro portador de *T. cruzi*. Estes parasitas passam então para o intestino médio do vetor, multiplicam-se como epimastigotas e no decorrer de algumas semanas migram para o intestino posterior, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Ao picarem um novo vertebrado, os insetos defecam, depositando suas fezes e urina com parasitas sobre a pele ou mucosas do hospedeiro. A penetração destes no organismo pode se dar diretamente nas mucosas ou quando o indivíduo coça o local da picada, promovendo uma lesão tecidual. A partir daí, os tripomastigotas metacíclicos podem invadir uma variedade de tipos celulares, onde se diferenciam em amastigotas, que começam a se multiplicar após um período de 20 a 30 horas. No final da fase de multiplicação, quando a célula está abarrotada de parasitas, os amastigotas diferenciam-se novamente em tripomastigotas, que escapam das células hospedeiras para os espaços intercelulares ou ganham a circulação. Estes tripomastigotas, chamados tripomastigotas sanguíneos, podem então invadir novos macrófagos ou células de outros tecidos e órgãos do hospedeiro, ou serem ingeridos pelo inseto durante seu repasto sanguíneo.

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

Utilizando um anticorpo monoclonal que reconhece um antígeno de superfície específico de amastigotas (Ssp-4), Andrews et al. (1987) demonstraram que cerca de 10% das formas circulantes de *T. cruzi* em camundongos infectados na fase aguda eram amastigotas. Eles concluíram que a diferenciação de formas tripomastigotas pode ocorrer não somente intracelularmente, mas também no sangue de hospedeiros

vertebrados. Corroborando esta hipótese, foi demonstrado que tripomastigotas se transformam em amastigotas quando incubados por tempo prolongado (24-48 h) em pH neutro (ANDREWS et al., 1988; LEY et al., 1988). Além disso, também foi observado que a transformação extracelular de tripomastigotas em formas arredondadas pode ser acelerada em baixo pH (KANBARA et al., 1990) e que estes parasitas se parecem com amastigotas quando observados por microscopia de luz. Tomlinson et al. (1995) verificaram que estas formas arredondadas eram estrutural e bioquimicamente indistinguíveis de amastigotas naturais.

Diante destes resultados acredita-se na existência de um ciclo alternativo envolvendo formas amastigotas no hospedeiro mamífero originárias da lise prematura das células infectadas, designadas amastigotas intracelulares (HUDSON et al., 1984; McCABE et al, 1984; UMEZAWA et al., 1985), ou por diferenciação extracelular de tripomastigotas, designados amastigotas extracelulares (PAN, 1978a; ANDREWS et al., 1987; LEY et al., 1988; MORTARA, 1991), sendo estes amastigotas intracelulares e extracelulares capazes de invadir células fagocíticas e não fagocíticas. *In vivo*, amastigotas extracelulares foram inoculados intraperitonealmente em animais A/J e todos, não somente se infectaram, como também tiveram alta mortalidade, após 18-25 dias de infecção (FERREIRA et al, 2012).

Outra distinta forma de *T. cruzi*, a qual ainda não é usualmente relatada como fazendo parte de seu ciclo, são as formas *epimastigotas-like* intracelulares. Tais formas foram descritas pela primeira vez em células de cultura de tecido, por Meyer e Oliveira (1948) (citado por ALMEIDA DE FARIA et al, 1999). Posteriormente Almeida de Faria et al (1999) demonstraram que tais formas transientes compartilham algumas características com amastigotas e tripomastigotas, mas suas propriedades predominantes são de epimastigotas, incluindo o formato, o que levou à denominação de epimastigotas intracelulares. O uso de um anticorpo monoclonal 3C5 permitiu a detecção desses epimastigotas como formas transientes entre ama e tripomastigotas ao entorno do 5º ou 6º dia de infecção.

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

o ciclo doméstico resulta do contato entre o homem e o vetor, provocado por modificações ecológicas e sociais no ambiente (DIAS, 1987).

Além do mecanismo vetorial, a transmissão da doença de Chagas pode também ocorrer por transfusão sanguínea, transmissão congênita, infecções laboratoriais acidentais, transplante de órgãos e por via oral (DIAS, 1992). O primeiro surto de infecção humana por *T. cruzi* por via oral foi relatado em 1968, em uma escola agrícola do município de Estrela (RS), onde 17 alunos apresentaram um quadro agudo da doença de Chagas e seis morreram. A fonte exata de contaminação não foi esclarecida: suspeita-se de alimento contaminado com o parasita. Outro surto semelhante ocorreu em Catolé do Rocha (PB), atingindo 26 pessoas, das quais uma faleceu (revisado em STEINDEL et al., 2005). No período de 1968 a 2000, mais de 50% dos casos agudos de Doença de Chagas registrados na Amazônia brasileira foram atribuídos a microepidemias de infecção transmitida oralmente (COURA et al., 2002). Houve um surto de doença de Chagas cuja transmissão estava relacionada ao consumo de caldo de cana de um único ponto de venda nas margens da BR 101 (Barracão Penha II) no município de Navegantes (SC), no dia 13 de fevereiro de 2005. Foram confirmados 25 casos, sendo que três se tornaram óbitos. No local da transmissão, foram capturados reservatórios (gambá) e vetor silvestre (*T. tibiamaculata*) da doença, ambos infectados por *T. cruzi* (STEINDEL et al., 2005; NÓBREGA et al, 2009; BASTOS et al, 2010; ANDRADE, GOLLOB, DUTRA, 2014).

A infecção por *T. cruzi* em humanos possui apresentação clínica variável. A fase aguda inicial é caracterizada por parasitemia patente que pode perdurar por 40 a 60 dias. Os sintomas podem ser moderados e atípicos, podendo ser confundidos com os de diversas outras infecções, e conseqüentemente a infecção não é frequentemente reconhecida neste estágio (WHO, 2002). Neste período, as formas amastigotas podem ser vistas no interior de fibras cardíacas (TORRES, 1917), células musculares lisas e esqueléticas, células endoteliais, gliais, macrófagos e fibroblastos. Essa fase representa o primeiro contato entre o parasito e o hospedeiro, o momento em que a resposta imunológica será ativada. É possível que eventos imunológicos que se iniciam durante a fase aguda irão influenciar no desenvolvimento da doença direcionando a uma resposta protetiva ou patogênica na fase crônica. Entretanto, a baixa detecção de indivíduos nessa fase limita o diagnóstico e, conseqüentemente, a possibilidade de estudos sobre o perfil imunológico durante a fase aguda da doença (NÓBREGA et al, 2009; BASTOS et al, 2010; ANDRADE, GOLLOB, DUTRA, 2014).

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

Apesar da doença de Chagas exibir variáveis cursos clínicos, o fenômeno fundamental de sua variabilidade ainda não é compreendido. Vários estudos têm mostrado que diferentes manifestações clínicas da doença podem estar relacionadas a diferenças na resposta imune (MARIN-NETO et al, 2007; ARCCE-FONSECA et al, 2005; MANOEL-CAETANO, SILVA, 2007), assim como na patogenicidade de *T. cruzi*, já que tal espécie é heterogênica, composta por várias subpopulações que circulam entre vertebrados domésticos e selvagens (OLIVEIRA et al, 2012). Além disso, a existência de diferentes cepas de *T. cruzi* com tropismos distintos para órgãos diversos já fora reportado em diversos estudos (VIANNA, 1911; CAMPOS, 1927, TALIAFERRO, PIZZI, 1955; BICE, ZELEDON, 1970; ANDRADE, 1973; HANSON, ROBERSON, 1974).

A localização preferencial de *T. cruzi* em certos órgãos, tais como pâncreas (WATKINS, 1966), bexiga (BICE, ZELEDON, 1970), tecido adiposo (SHOEMAKER et al., 1970), musculature lisa, esquelética e cardíaca (BICE, ZELEDON, 1970; TAY et al., 1973; HANSON, ROBERSON, 1974) há muito fora reportada. Andrade (1973) descreveu 16 cepas coletadas em uma mesma área endêmica no Brasil, que apresentavam miocárdio-tropismo, lesões cardíacas proeminentes e baixa infecção no baço e fígado. Somente uma a cada quatro cepas estudadas apresentaram tropismo para o Sistema nervoso central (AMARAL et al., 1975). Há evidências, portanto, de que parasitos de distintas populações são capazes de invadir seletivamente determinados órgãos e tecidos, ou prevenir sua internalização por alguns tipos específicos de células (MELO, BRENER, 1978).

Em determinado estudo, ao infectar experimentalmente alguns camundongos, Andrade et al (1999, 2002) demonstraram uma diferença na distribuição tecidual de

duas cepas distintas de *T. cruzi*, Col1.7G2 e JG (pertencentes à *T. cruzi* I e II, respectivamente). Análises de tecidos provenientes de camundongos infectados cronicamente revelaram, não somente uma distribuição tecidual preferencial, como também a interação durante uma infecção mista. Tais pesquisadores detectaram parasitos de ambas as cepas no coração de animais infectados isoladamente com cada uma delas. Entretanto, em camundongos infectados simultaneamente com as duas cepas, o coração fora parasitado exclusivamente por JG, indicando uma dominância desta perante Col1.7G2. Em trabalho mais atual desses mesmos autores, diferenças no comportamento dessas duas cepas foram detectados em análises *in vitro*, usando cultura primária de cardiomiócitos. *In vitro*, a cepa Col1.7G2 apresentou maior infecção do que JG, diferentemente do que haviam observado anteriormente. Entretanto, em ensaios de multiplicação, após 48 e 72 horas, o número de parasitos intracelulares de JG foi maior que o de Col1.7G2. Dessa forma, esses dados sugerem que, não somente o processo de interação e invasão do parasito, como também o desenvolvimento intracelular do mesmo, é importante para determinar a colonização tecidual por *T. cruzi*. Outro estudo, entretanto, no qual também se avaliou a distribuição de duas cepas distintas de *T. cruzi* (Y e JLP) nos diferentes órgãos de camundongos infectados, durante as fases aguda e crônica, não foram observadas diferenças de tropismo, detectando-se por PCR a presença homóloga de parasitos no fígado, pulmão, rins e coração (OLIVEIRA et al, 2012).

A prevalência das formas clínicas e morbidade da doença de Chagas apresentam variações geográficas. Por exemplo, patologias digestivas associadas à infecção por *T. cruzi* predominam no Chile e no Brasil central, mas são bastante incomuns na Venezuela e na América Central (WHO, 2002). Por outro lado, a infecção por *T. cruzi* na bacia Amazônica tende a ser mais branda do que em áreas endêmicas e freqüentemente conduz à forma indeterminada da doença. Estas diferenças geográficas podem estar relacionadas em parte aos aspectos genéticos e imunológicos da população humana local, mas acredita-se que elas são causadas principalmente pelas diferenças genéticas de *T. cruzi*. Quando diferentes isolados de *T. cruzi* são comparados, observam-se perfis genéticos e proteicos polimórficos (ZINGALES et al., 1998; COURA et al., 2002).

Os primeiros trabalhos que avaliaram polimorfismo em *T. cruzi*, como o padrão de zimodemas descrito por Miles et al. (1978), indicaram a existência de pelo menos três subdivisões na população do parasita, sendo uma linhagem composta

principalmente por cepas híbridas. A identificação de marcadores moleculares como D7 – 24Sα rDNA e genes mini-exon permitiram uma clara distinção entre cepas de *T. cruzi* em dois grandes grupos, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (SOUTO et al., 1996; NUNES et al., 1997). Estas linhagens divergentes ocupam ambientes ecológicos distintos: o ciclo silvestre (*T. cruzi* I) e ciclo doméstico (*T. cruzi* II) da doença de Chagas (BRIONES et al., 1999; ZINGALES et al., 1999), bem como se associam a hospedeiros silvestres distintos (YEO et al., 2005). Ao contrário de cepas de *T. cruzi* I que induzem baixo parasitismo e conduzem a um quadro assintomático em pacientes chagásicos humanos, cepas de *T. cruzi* II causam infecções com parasitemia alta (ZINGALES et al., 1999). Análises baseadas em DNA polimórfico amplificado randomicamente (RAPD), *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) e cariotipagem permitiram a divisão de *T. cruzi* II em cinco sub-grupos (BRISSE et al., 2000a; BRISSE et al., 2000b; HENRIKSSON et al., 2002), sendo que alguns destes subgrupos são híbridos, consistente com a hipótese de que recombinação genética tenha ocorrido mais de uma vez dentre as linhagens de *T. cruzi* (STURM et al., 2003).

Mais recentemente, as cepas de *T. cruzi* foram divididas em seis unidades de tipagem discretas (*discrete typing units – DTU*) de acordo com seu conteúdo genético. Estes grupos foram designados *T. cruzi* I a VI (ZINGALES et al., 2009). A distribuição geográfica destes grupos indica que *T. cruzi* II a VI são os principais agentes causadores da doença de Chagas no sudeste de partes da América do Sul, sendo *T. cruzi* I presente apenas no ciclo silvestre (ZINGALES et al 2009; Di NOIA et al., 2002; FERNANDES et al., 1999). Por outro lado, *T. cruzi* I foi descrito como agente primário da doença em humanos na Colômbia, Venezuela e América Central (AÑEZ et al., 2004; BLACK et al., 2007; MEJIA-JARAMILLO et al., 2009; ESPINOZA et al., 2009).

A distribuição na América do Sul indica que TcI é a DTU mais abundante e dispersa, já que é encontrada desde a América Central até o Norte da América do Sul, e inclui casos crônicos de cardiomiopatia e severos de meningo-encefalopatia. As DTUs TcIII e TcIV tem sido predominantemente associadas com o ciclo silvestre do parasito na América do Sul, enquanto que TcV e TcVI são relacionados ao ciclo doméstico no sudeste e partes centrais da América do Sul. A maioria de TcII tem sido encontradas em países na América do Sul, tais como Brasil, Argentina e Chile, e tem sido associada ao ciclo doméstico culminando em formas crônicas severas da doença de Chagas, incluindo manifestações cardíacas e digestivas (MILES et al. 1981, ZINGALES et al.

1998, 2012, FREITAS et al. 2005, LAGES-SILVA et al. 2006; ESPINOZA et al, 2011; DUZ et al, 2014).

1.3 Mecanismos de invasão celular

O parasitismo exercido por organismos intracelulares representa um evento complexo, usualmente envolvendo um ligante na superfície do patógeno e um receptor na célula hospedeira (BEACHEY, 1981). Neste contexto, a superfície celular desempenha o principal papel no estabelecimento de qualquer relação parasita-hospedeiro e a identificação das moléculas envolvidas neste processo torna-se um passo obrigatório.

Classicamente, a interação entre células hospedeiras e *T. cruzi* foi dividida em duas fases: adesão (reconhecimento de moléculas específicas do parasito pela célula hospedeira) e internalização (De SOUZA, CARVALHO, BARRIAS, 2010). O processo de internalização é descrito por várias vias envolvendo mecanismos endocíticos. Várias moléculas de *T. cruzi* tem sido descritas como importantes nesse reconhecimento inicial. Uma das classes dessas moléculas são as mucinas, principais glicoproteínas de superfície desse parasito. Várias mucinas têm sido reportadas como ligantes de *T. cruzi*, principalmente devido a seus resíduos de açúcar, que interagem com receptores específicos das células hospedeiras (SIBLEY, ANDREWS, 2000). Outras moléculas são as trans-sialidades e as glicoproteínas (gp82, gp80, gp35/50, gp85) (SCHENKMAN, DIAZ, NUSSENZWEIG, 1991). Em relação às células hospedeiras de mamíferos, várias moléculas já foram estabelecidas como reconhecedoras ou receptores de *T. cruzi*. A maioria das classes desses receptores caracterizadas são as de carboidratos que contêm resíduos de galactosil, manosil e sialil e também proteínas do tipo lectina, como galectina-3, capaz de se ligar em resíduos de carboidratos do parasito (ALVES, COLLI, 2008; TOMLINSON et al, 1994; MOODY, OCHIENG, VILLALTA, 2000; KLESCHENKO et al, 2004; BARRIAS, CARVALHO, De SOUZA, 2013).

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

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

Outro mecanismo endocítico induzido para internalização de *T. cruzi* seria a endocitose mediada por clatrina. Recentemente Nagajyotic (2011) e colegas demonstraram que receptores de LDL seriam importantes para adesão e invasão de *T. cruzi* na célula hospedeira. Esta demonstração indica o envolvimento de clatrina, já que tais receptores se concentram em vesículas revestidas por clatrina. Ao realizarem imunofluorescência marcando tal molécula, observaram marcação da mesma ao entorno do vacúolo parasitóforo (BARRIAS, CARVALHO, De SOUZA, 2013).

Microdomínios da membrana da célula hospedeira também são envolvidos na internalização por *T. cruzi*. Fernandes et al (2007) e Barrias et al (2007) demonstraram que o colesterol (principal constituinte de balsas lipídicas na membrana), está envolvido na entrada desse protozoário, já que o tratamento com drogas que removem tais componentes na célula (β -ciclodextrina e filipina) impedem a internalização do parasito (BARRIAS, CARVALHO, De SOUZA, 2013).

Estudos demonstraram que durante a invasão celular por TCT ocorre recrutamento e fusão de lisossomos à membrana plasmática da célula hospedeira no sitio de invasão do parasita de maneira dependente de cálcio (TARDIEUX et al., 1992; TARDIEUX et al., 1994). De acordo com este modelo, TCTs acionam um processo de sinalização que culmina com a formação do vacúolo parasitóforo (BURLEIGH; ANDREWS, 1998; BURLEIGH; WOOLSEY, 2002). Novas evidências surgem apontando para a participação de componentes anteriores da via endocítica, como dinamina e Rab5 indicando que o processo lisossomal deve ser mais elaborado e deve ocorrer após eventos primários (WILKOWSKY et al., 2002). Evidências mostram que formas tripomastigotas metacíclicos da cepa CL (*T. cruzi* VI) podem também recrutar

EEA-1 (*early endosome antigen 1*) durante a invasão de células Vero infectadas com *Coxiella burnetii* (ANDREOLI; MORTARA, 2003).

Por meio de uma metodologia mais quantitativa na tentativa de identificar o papel da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K) na via lisossomal, Woolsey et al. (2003) confirmaram as observações feitas previamente por Wilkowsky et al. (2001) de que este componente celular poderia estar envolvido em uma via de internalização de TCTs independente de lisossomos. Tripomastigotas que invadem por esta via mobilizam inositóis fosforilados durante a formação do vacúolo parasitóforo inicialmente rico em marcadores de membrana e que depois se matura, tornando-se rico em marcadores lisossomais (LAMP-1) (WOOLSEY et al., 2003). Estudos demonstraram que a polimerização do citoesqueleto de actina é fundamental para a permanência dos parasitas internalizados bem como para a fusão destes com lisossomos (WOOLSEY; BURLEIGH, 2004). Neste contexto, verificou-se que a fusão do parasita com lisossomos logo após a invasão é essencial para a retenção intracelular dos parasitas. Durante o processo de internalização, o vacúolo parasitóforo funciona como um centro organizador de microtúbulos. Acredita-se que esta é uma etapa crítica no desenvolvimento de uma infraestrutura necessária para o transporte de lisossomos para o local da adesão parasita-célula (TYLER et al., 2005). Cerca de 2 h após a infecção, TCTs rompem o vacúolo parasitóforo pela ação de uma hemolisina ativa em pH ácido (ANDREWS, WHITLOW, 1989; ANDREWS et al., 1990) e entram no citoplasma, onde se multiplicam livremente como amastigotas (HALL, 1993; FERNANDES, ANDREWS, 2012).

Tripomastigotas metacíclicos invadem células HeLa penetrando em suas bordas (MORTARA, 1991), um comportamento característico de formas altamente móveis descrito por Schenkman et al. (1988). Durante a invasão de células HeLa, estas formas induzem a formação de protruções ricas em actina ao redor do parasita (SCHENKMAN; MORTARA, 1992). Este fenômeno de protrusão de membrana não foi inibido por tratamento com citocalasina D, indicando que era devido principalmente ao parasita, sendo detectado em células HeLa mas não em MDCK (SCHENKMAN; MORTARA, 1992). Por outro lado, amastigotas extracelulares agregam filamentos de actina por adesão às microvilosidades da superfície dorsal de células HeLa (MORTARA, 1991). Este processo é acompanhado pela formação de estruturas semelhantes a xícara embaixo do parasita culminando com a invasão celular (PROCÓPIO et al., 1999). Tratamento com citocalasina D inibe a invasão de células

Vero e HeLa por formas amastigotas extracelulares, contrastando com o efeito exercido na entrada de tripomastigotas metacíclicos (PROCÓPIO et al., 1998). Estes resultados são consistentes com o fato de que cada estágio evolutivo do parasito e cada célula hospedeira mobilizam componentes de interação específicos.

Durante a invasão celular, formas infectivas (tripomastigotas metacíclicos, TCT e amastigotas extracelulares) de diferentes cepas mobilizam moléculas distintas para interagir com componentes da célula hospedeira. Diante da descrição na literatura de uma série de componentes envolvidos na invasão celular por tripomastigotas metacíclicos, TCT e alguns aspectos da invasão por amastigotas extracelulares, pode-se visualizar o seguinte cenário em uma infecção *in vivo*: considerando uma infecção oral, principal forma de transmissão vetorial atualmente no Brasil, tripomastigotas metacíclicos ao atingir o estômago resistem à degradação devido à proteção exercida pelas mucinas, protease-resistentes gp35/50, as quais são abundantes na superfície do parasita. A digestão por pepsina deixa intacto o domínio da gp82 que contém ambos os sítios de ligação à célula hospedeira e à mucina gástrica. Ao aderir à mucina gástrica o parasita atravessa o muco para atingir as células epiteliais subjacentes. Uma vez rompida a barreira, os tripomastigotas metacíclicos da cepa CL invadem eficientemente as células epiteliais da mucosa gástrica mobilizando a gp82 e ativando sinal de cálcio bidirecional. Os parasitas da cepa G podem atingir as células epiteliais de forma tão eficiente quanto a CL, mas a invasão pode ser impedida pela gp90. Alguns parasitas (Cepa G) mobilizam a sua internalização por meio da gp35/50. Por outro lado, parasitas deficientes na gp82 e que expressam a gp30 como os isolados 569 e 588 teriam dificuldade em penetrar na camada grossa de mucina, porque a gp30 liga-se fracamente a mucina gástrica (NEIRA et al., 2003; CORTEZ et al., 2003; YOSHIDA, 2006).

Durante o curso da infecção, formas tripomastigotas sanguíneos contraparte das formas TCTs precisam superar as barreiras impostas pela matriz extracelular antes de atingir a célula alvo. Diante do arsenal de moléculas descritas envolvidas na invasão celular *in vitro* por estas formas, pode-se visualizar o seguinte panorama: Através de glicoproteínas de superfície pertencentes à super-família da transialidase-gp85 o, parasita liga-se a fibronectina e laminina (QUIASSI et al., 1986; GIORDANO et al., 1994, 1999) abrindo caminho para a ação da POP Tc80 que hidrolisa colágeno (SANTANA et al., 1997; GRELLIER et al., 2001). Ao ligar-se a célula hospedeira através da Tc85 (ALVES et al., 1986), gp 83 (VILLALTA et al., 2001), Tc-1 (AUGUSTINE et al., 2006) ocorre posteriormente ativação da oligopeptidase B

(BURLEIGH; ANDREWS, 1995a; CALER et al., 1998) do parasita que gera o fator solúvel agonista de cálcio a partir de um precursor. Ativação da mobilização de cálcio na célula hospedeira a partir deste fator secretado pelo parasita promove a invasão celular. Alternativamente ou simultaneamente, cruzipaina é secretada pelos TCTs aderidos a célula alvo, e sua atividade no cininogênio gera cininas que também induzem resposta de cálcio ao interagirem com seus receptores (SCHARFSTEIN et al., 2000; TODOROV et al., 2003). Durante este processo, a gp83 secretada pode induzir aumento na síntese de laminina γ -1 pela célula hospedeira (NDE et al., 2006), bem como a galectina-3 humana pode aumentar a adesão do parasita a laminina (MOODY; OCHIENG; VILLALTA, 2000), contribuindo para maior invasão celular. Neste ínterim, células infectadas podem romper-se liberando amastigotas, bem como tripomastigotas sanguíneos presentes na circulação podem transformar-se em amastigotas extracelulares. Estes amastigotas são resistentes à lise pelo sistema complemento (IIDA et al., 1989) e provavelmente tem sua sobrevivência garantida após fagocitose por macrófagos devido à manutenção de um ambiente imunossupressor com atividade de TGF- β e IL-10. Estas citocinas impedem a ativação de macrófagos, permitindo que os amastigotas escapem no citosol e comecem a multiplicar (SCHARFSTEIN; MORROT, 1999). Formas amastigotas podem também infectar células não fagocíticas por um mecanismo dependente de actina e assim, por estes mecanismos, contribuir para a perpetuação da doença (PROCÓPIO et al., 1998; 1999).

Formas amastigotas podem utilizar epítomos de carboidrato presentes em Ssp-4 para aderirem às proteínas com atividade lectínicas da célula hospedeira. Após a adesão, acredita-se que a P21 (SILVA et al., 2009) é secretada na justaposição parasita-célula hospedeira e ativa uma cascata de sinalização ainda desconhecida que leva a formação de ondas de actina em torno do parasita com ativação da GTPase Rac 1 (FERNANDES; MORTARA, 2004) e recrutamento de microdomínios enriquecidos em colesterol e GM1 na célula hospedeira (FERNANDES et al., 2007) bem como mobilização de cálcio dos acidocalciosomas e fosforilação de componentes de 87 e 175 kDa no parasita (FERNANDES et al., 2006), culminando com sua internalização.

Cruz e colaboradores (2012) demonstraram que o tratamento de células HeLa com amastina recombinante, uma glicoproteína de superfície abundante em amastigotas, reduziu a infectividade de AE. Além disso, a expressão ectópica de amastina por *T. cruzi* acelerou a diferenciação de amastigotas em tripomastigotas. Esses resultados posicionam amastina como uma potencial molécula de amastigotas capaz de regular a

invasão e diferenciação de AE dentro de células de mamíferos. Além disso, acredita-se que a amastina deve induzir, na célula hospedeira, vias de sinalizações específicas que culminem com a entrada do parasito nas mesmas (FERREIRA et al, 2012).

Proteína *moonlighting* refere-se a um fenômeno em que uma proteína pode realizar mais de uma função, incluindo funções não esperadas (Jeffery, 2009). Muitas dessas proteínas são enzimas envolvidas na glicólise. Tem sido sugerido que de 7-10 enzimas da glicólise, assim como 7-8 enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico, exibem características *moonlighting*. Recentemente foi caracterizada uma proteína *moonlighting* em *T. cruzi*, denominada mevalonato-quinase (MVK), enzima envolvida na síntese de isoprenóides. Como parte do processo de infecção de *T. cruzi*, essa proteína é envolvida tanto na invasão do parasito, quanto na indução de sinalizações na célula hospedeira. Análises de microarray em AE demonstraram que houve alta expressão de mevalonato na cepa G (de maior infectividade *in vitro*) do que na CL (menos infectiva *in vitro*), sugerindo importante papel dessa proteína na infectividade de AE (FERREIRA et al, 2012).

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

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

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

Há o consenso de que durante a fase aguda de *T. cruzi*, uma resposta robusta é desenvolvida no hospedeiro, o que leva ao controle de parasitemia. Embora o exato mecanismo que media o controle parasitário não tenha sido totalmente identificado em humanos, acredita-se que realmente envolva a atuação de células da imunidade inata, tais como NK, neutrófilos e macrófagos. NK são importantes fontes de IFN- γ e TNF- α , críticos para a ativação de macrófagos em sua propriedade microbicida. Tal resposta parece ser proveniente do reconhecimento de moléculas de superfície de *T. cruzi*, principalmente por receptores *Toll-like*. Algumas das principais moléculas envolvidas são mucinas-GPI (glicosilfosfatidilinositol), extremamente abundantes na superfície do parasito (SATHLER et al, 2003; BUSCAGLIA et al, 2006). Enquanto a ativação de células T é observada durante a fase aguda, o aparecimento de células T antígeno-específicas é mais tardio, possivelmente devido a uma imunossupressão observada em pacientes na fase aguda (OUAISSI et al, 2001; ANDRADE, GOLLOB, DUTRA, 2014).

Avanços no conhecimento dos mecanismos associados à patologia e resposta imunológica contra a infecção por *T. cruzi* tem se beneficiado por dados gerados a partir de modelos murinos. Estes modelos demonstraram que as respostas imunes inata e adaptativa desempenham um importante papel no controle do parasita, lançando mão de ações combinadas de vários tipos celulares incluindo células matadoras naturais (NK), linfócitos T CD4+, T CD8+, macrófagos bem como de anticorpos produzidos por linfócitos B (BRENER, GAZZINELLI, 1997; DOS REIS, 1997). Resistência a infecção por *T. cruzi* se associa com a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IFN- γ e a produção local de RANTES (“*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*”), MIP-1 α (“*macrophage inflammatory protein 1 alpha*”), MIP-1 β (“*macrophage inflammatory protein 1 beta*”) e MCP-1 (“*monocyte chemoattractant protein-1*”). Estas citocinas ativam a produção de óxido nítrico por macrófagos, os quais são responsáveis pela eliminação do parasita (ALIBERTI et al., 1996; ALIBERTI et al., 1999; ANTUNEZ; CARDONI, 2000; TALVANI et al 2000; revisado por GUTIERREZ et al., 2009). TNF- α também pode ativar macrófagos como segundo sinal para a produção de óxido nítrico (ALBRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996).

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

Originalmente descrita como um fator indutor de IFN- γ (NAKAMURA et al, 1989), IL-18 é uma citocina pró-inflamatória estruturalmente relacionada à IL-1 β , com efeitos pleiotrópicos contribuindo para a resposta imune inata e adaptativa (PUREN et al, 1998; MAILLIARD et al, 2005). IL-18 tem demonstrado agir sinergicamente com IL-12 na indução de IFN- γ por células NK e linfócitos T. Tal citocina também está envolvida no aumento de expressão de outras citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. O papel de IL-18 na infecção por *T. cruzi* não é completamente compreendido. Alguns trabalhos sugerem que a ausência de IL-18 durante a infecção por tal protozoário resulta na diminuição de IFN- γ (GROEFE et al, 2003). Determinado trabalho foi realizado utilizando-se de animais nocautes para IL-18 infectados com *T. cruzi*, para investigar seu papel na patogênese de tal infecção, bem como na indução de miocardite. Nesse estudo, os dados sugerem que IL-18 contribui para a patogênese da miocardite em um modelo experimental de infecção por *T. cruzi*, principalmente durante a infecção pela cepa Colombiana, enquanto que para a cepa Y IL-18 pareceu não ter efeito significativo. Tais observações realçam o fato de que indução de miocardite deve ser dependente da cepa do parasito (ESPER et al, 2014). Pelo contrário, o perfil de citocinas IL-10, IL-4 e TGF- β estão associadas com a susceptibilidade ao parasita

(RODRIGUES et al., 2000; HIYAMA et al., 2001). Contudo, determinado estudo demonstrou que IL-10 atua como fator de proteção contra processo de miocardite em animais infectados com *T. cruzi*, sendo benéfico ao hospedeiro (ROFFE et al, 2012).

Células dendríticas (DC) são células apresentadoras profissionais (APC), com papel essencial na iniciação e desenvolvimento da imunidade e tolerância (Lanzavecchia, Sallusto, 2000; Steinman et al.,2003). Os lipopolissacarídeos (LPS) induzem a maturação de células dendríticas via TLR4 (De SMEDT et aL., 1996; VERHASSELT et al., 1997), entretanto, um novo subtipo de DCs foi identificado, apresentando produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10, e baixa secreção de IL-12 (AKBARI et al., 2001; ZHANG et al., 2004). Vários grupos reportaram que certas proteínas de *T. cruzi*, tais como Tc52 e âncoras de GPI, induzem a maturação de DC, dependente da ativação por TLR-2 (CAMPOS et al., 2001; OUAISSI et al., 2002; ROPERT, GAZZINELLI, 2004). Do contrário, também fora demonstrado que GIPL do parasito interferem na resposta de DCs (BRODSKYN et al., 2002), podendo induzir a um fenótipo de células produtoras de IL-10 e com baixa secreção de IL-12 (PONCINI et al., 2008; PONCINI et al, 2010).

Recentemente foi verificado que a IL-17 constitui um importante fator para proteção contra a fase aguda da infecção por *T. cruzi* (MIYAZAKI et al., 2010). Outro estudo também forneceu tais evidências, de que IL-23 e IL-17 contribuem para a defesa contra *T. cruzi*. Além disso, observaram também que IL-23 contribui para a patologia no fígado induzida pela infecção por tal protozoário, já que animais WT infectados exibiram extensas áreas necróticas no fígado, enquanto camundongos IL-23p19^{-/-} apresentaram infiltrados inflamatórios mas não regiões de necrose (ERDMANN et al, 2013).

Em 2001, o grupo de pesquisa liderado pelo Dr. Gazzinelli apresentou o primeiro exemplo de reconhecimento por receptores Toll-like (TLR) de proteínas pertencentes a grande família das mucinas de *T. cruzi*, com a produção por macrófagos de interleucina-12 (IL-12), óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral (TNF) dependente da ativação de TLR-2 (CAMPOS et al., 2001). Em seguida, foi demonstrado por outro grupo que a proteína Tc52 ativa células dendríticas via TLR-2 (OUAISSI et al., 2002). Posteriormente foi verificado que TLR-4 reconhece glicoinositolfosfolípidios livres (OLIVEIRA et al., 2004) e TLR-9 esta associado ao reconhecimento de ilhas de CpG presentes no DNA do parasita (BAFICA et al., 2006; KAYAMA, TAKEDA, 2010).

Estudo recente descreveu alguns dos principais sinais de danos envolvendo a resposta imune no fígado durante a infecção aguda por *T. cruzi* em modelos animais de linhagens diferentes. Os autores verificaram que leucócitos hepáticos de camundongos C57BL/6 infectados produziram maiores quantidades de citocinas pró-inflamatórias, enquanto que IL-10 e TGF- β foram somente detectadas por leucócitos hepáticos de camundongos BALB/c. Curiosamente, uma maior expressão de TLR-2 e TLR-4 foi observada em hepatócitos de camundongos BALB/c infectados. Por outro lado, a resposta pró-inflamatória observada nos animais C57BL/6 estava diretamente associada com expressão alta e constante de TLR-9 e iNOS. O pré-tratamento dos animais C57BL/6 com agonista de TLR-2 (Pam3CSK4) levou a redução dos níveis de atividade de transaminase bem como no número de focos inflamatórios no fígado dos mesmos, demonstrando assim, um importante papel de TLR-2 na atenuação da intensa resposta inflamatória no fígado durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* (CARRERA-SILVA et al., 2010).

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

O início da imunidade adaptativa é seguido pelo aumento de células B ativadas (MINOPRIO, 2001). Após 15 dias de infecção, são detectadas altas quantidades de IgM no soro de pacientes na fase aguda de Chagas (ANTAS et al, 1999), o que é usado como parâmetro sorológico (MEDRANO-MERCADO et al, 1996). Ainda no início da infecção, IgG específico e anticorpos líticos contra tripomastigotas são largamente detectados, o que pode ser um mecanismo de aumentar a resistência ao parasito (ANTAS et al, 1999; ANDRADE, GOLLOB, DUTRA, 2014). A resposta imune humoral constitui uma importante forma de se controlar a infecção, uma vez que a depleção de linfócitos B leva a aumento na parasitemia (KUMAR; TARLETON, 1998). Transferência adotiva de anticorpos de camundongos em estágios avançados da infecção por *T. cruzi* para camundongos conduz a uma rápida eliminação dos parasitas da circulação (BRODSKYN et al., 1989).

Transferência de esplenócitos de animais que se recuperaram da fase aguda da infecção para animais confere proteção contra infecção letal por *T. cruzi*, a qual não

acontece pela remoção dos linfócitos B, sendo relativamente insensível a remoção de linfócitos T ou macrófagos (SCOTT, 1981). Evidências sugerem que a maioria dos linfócitos B não apresenta especificidade ao parasita durante os estágios iniciais da infecção (MINOPRIO et al., 1988). Em um estudo inédito, onde se analisou resposta imune humoral policlonal e específica a infecção por *T. cruzi* em modelos animais de resistência (C57BL/6) e suscetibilidade (BALB/c) foi verificado que a ativação policlonal de linfócitos B leva a repostas de hiper-IgG estando assim associada com aumento na suscetibilidade a infecção e reforça a importância da interação parasita-hospedeiro no desenvolvimento de uma resposta imune humoral específica (BRYAN; GUYACH; NORRIS, 2010).

Dentre os vários mecanismos que buscam explicar a patogênese da doença de Chagas, a autoimunidade é um deles, o qual é suportado por evidências experimentais. Contudo, é alvo de críticas e questionamentos. Não há dúvidas de que um processo de autoimunidade resulta da infecção crônica por *T. cruzi*. O debate sobre as principais causas (autoimunidade X perpetuação parasitária) dos sintomas associados à doença crônica já vem sendo feito a longo prazo (KIERSZENBAUM, 1999; LEON, ENGMAN, 2003; TANOWITZ et al, 1992; TARLETON, 2001).

A infecção por *T. cruzi* induz autoimunidade humoral e celular, para uma diversidade de autoantígenos, incluindo miosina cardíaca (KIERSZENBAUM, 1999; LEON, ENGMAN, 2003). Já fora identificado que, dentro de semanas camundongos infectados com *T. cruzi* desenvolveram miocardite severa acompanhada por hipersensibilidade tardia (DTH) específica para miosina e produção de anticorpos específicos (NEU et al, 1987). Tais informações sugerem que o dano cardíaco pode levar ao desenvolvimento de autoimunidade nesse órgão, por meio da ativação de mecanismos que podem ativar linfócitos autoreativos (LEON, ENGMAN, 2001). Entretanto, há um grande número de dados suportando a teoria de que um mecanismo molecular de mimetização é responsável pelo desenvolvimento da autoimunidade (GIORDANENGO et al, 2000; CUNHA-NETO et al, 1996). Para investigar se antígenos de *T. cruzi* poderiam induzir autoimunidade no coração de animais infectados, Leon et al (2004) imunizaram tais animais com extrato do parasito e observaram que esses desenvolveram DTH específica para miosina e anticorpos, mas não desenvolveram miocardite. Igualmente importante, a imunização de camundongos com miosina cardíaca induziu resposta celular e humoral específica para *T. cruzi*, indicando que a reatividade cruzada imunológica entre *T. cruzi* e miosina é bidirecional. Tais

resultados sugerem que o dano cardíaco não é requerido para indução de uma autoimunidade à miosina ocasionada por *T. cruzi*, e que, tanto a ativação e reatividade cruzada antigênica devem contribuir para o desenvolvimento de um processo autoimune.

A persistência do parasito no hospedeiro depende da combinação de diversos fatores, incluindo a liberação de moléculas que interferem com a resposta imune. Trabalhos anteriores demonstraram que *T. cruzi* suprime a ativação de linfócitos, efeito dependente da densidade de parasitos (MALECKAR, KIERSZENBAWM, 1983). Portanto, a supressão induzida por moléculas do parasito é mais relevante na fase aguda, quando a concentração de tais moléculas pode estar aumentada. Além disso, a depleção de células T pode ser observada durante o pico de parasitemia (CHAUSSABET et al, 2003). Juntos, tais fatores contribuem para a imunossupressão, e promovem a manutenção da infecção. Talvez como consequência de uma imunização precoce, o início de uma resposta de células T antígeno-específicas contra *T. cruzi* é retardado, comparado a outras infecções (MARTIN et al, 2006).

A maioria dos indivíduos que entra na fase crônica se mantem na forma clínica indeterminada, a qual é assintomática e representa um excelente exemplo de equilíbrio entre o parasito e o hospedeiro (DUTRA et al, 2009). A forma indeterminada (assintomática) da doença tem sido associada com a predominante produção de citocinas regulatórias, tais como IL-10, e ainda com a baixa secreção de citocinas inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α . (SOUZA et al, 2007; de ARAÚJO et al, 2012). Dessa forma, é possível que a habilidade de produzir IL-10 ao final da fase aguda seja de extrema importância para controlar a resposta e induzir a cronificação da doença. Um balanço fino entre citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias e uma resposta celular efetiva deve ser alcançado para manter os níveis de parasito baixos e ainda evitar o dano tecidual (ANDRADE, GOLLOB, DUTRA, 2014).

A maioria dos dados publicados sobre a resposta imune foi obtida a partir de estudos com camundongos infectados com parasitas dos grupos *T. cruzi* II – VI, sendo que as diferenças genéticas entre *T. cruzi* I e *T. cruzi* II – VI são bastante significativas. Portanto, justificam-se estudos que avaliem a resposta imunológica contra cepas pertencentes ao grupo I. Recentemente, um trabalho demonstrou que cepas pertencentes ao grupo I com diferentes capacidades infectivas induziram diferentes respostas imunes humoral e celular (ESPINOZA et al., 2009). Outro estudo comparando *T. cruzi* I e *T. cruzi* II mostrou que o padrão de resposta imune humoral estava relacionado com o

genótipo do parasita, sendo que parasitas do grupo I eram mais eficientes em induzir super-expressão de todas as subclasses de IgG específicas (Dos SANTOS et al., 2009). Neste contexto, trabalhamos no laboratório com duas cepas de *T. cruzi*, a cepa G pertencente ao grupo I e a cepa CL pertencente ao grupo VI. Sabemos que formas tripomastigotas metacíclicas da cepa G apresentam baixa infectividade *in vitro* e nenhuma parasitemia *in vivo*. Enquanto que tripomastigotas metacíclicos da cepa CL são altamente infectivos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (revisado em YOSHIDA, 2006). Por outro lado, amastigotas extracelulares da cepa G apresentam alta infectividade *in vitro*, mas não induzem parasitemia *in vivo* e os da cepa CL são pouquíssimos infectivos *in vitro* e promovem parasitemia patente *in vivo* (SILVA et al., 2006). Diante deste paradoxo, uma pergunta é recorrente: Por que amastigotas extracelulares da cepa G que são altamente infectivos *in vitro* não promovem parasitemia em modelos murinos?

2.0 JUSTIFICATIVA

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

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

3.0 OBJETIVOS GERAIS

- Analisar o perfil imunológico mediante a infecção por *T. cruzi*, buscando identificar a atuação diferenciada dessa resposta frente a cepas (G e CL) e formas distintas do parasito (tripomastigotas metacíclicos ou amastigotas extracelulares);
- Analisar o tropismo diferencial das cepas G e CL de *T. cruzi* durante a infecção aguda e crônica;
- Caracterizar atividade biológica da proteína P21 de *T. cruzi*, buscando analisar sua função para o parasito e atuação na célula hospedeira.

4.0- ARTIGO 1- IFN- γ plays a unique role in protection against low virulent *Trypanosoma cruzi* strain

IFN- γ Plays a Unique Role in Protection against Low Virulent *Trypanosoma cruzi* Strain

Adele A. Rodrigues¹, Jasson S. S. Saosa^{2,3}, Grace K. da Silva², Flávia A. Martins¹, Aline A. da Silva¹, Cecílio P. da Silva Souza Neto¹, Catarina V. Horta⁴, Dario S. Zamboni⁴, João S. da Silva², Eloisa A. V. Ferro¹, Claudio V. da Silva^{1*}

1 Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, **2** Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, **3** Universidad Autónoma de Bucaramanga, Bucaramanga, Colômbia, **4** Departamento de Biología Celular, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Abstract

Background: *T. cruzi* strains have been divided into six discrete typing units (DTUs) according to their genetic background. These groups are designated *T. cruzi* I to VI. In this context, amastigotes from G strain (*T. cruzi* I) are highly infective *in vitro* and show no parasitemia *in vivo*. Here we aimed to understand why amastigotes from G strain are highly infective *in vitro* and do not contribute for a patent *in vivo* infection.

Methodology/Principal Findings: Our *in vitro* studies demonstrated the first evidence that IFN- γ would be associated to the low virulence of G strain *in vivo*. After intraperitoneal amastigotes inoculation in wild-type and knockout mice for TNF- α , Nod2, Myd88, iNOS, IL-12p40, IL-18, CD4, CD8 and IFN- γ we found that the latter is crucial for controlling infection by G strain amastigotes.

Conclusions/Significance: Our results showed that amastigotes from G strain are highly infective *in vitro* but did not contribute for a patent infection *in vivo* due to its susceptibility to IFN- γ production by host immune cells. These data are useful to understand the mechanisms underlying the contrasting behavior of different *T. cruzi* groups for *in vitro* and *in vivo* infection.

Citation: Rodrigues AA, Saosa JSS, da Silva GK, Martins FA, da Silva AA, et al. (2012) IFN- γ Plays a Unique Role in Protection against Low Virulent *Trypanosoma cruzi* Strain. PLoS Negl Trop Dis 6(4): e1598. doi:10.1371/journal.pntd.0001598

Editor: Genevieve Milon, Institut Pasteur, France

Received: January 29, 2011; **Accepted:** February 23, 2012; **Published:** April 3, 2012

Copyright: © 2012 Rodrigues et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by grants and fellowships from CAPES (process number: 3038.005295/2011-40), FAPEMIG (process number: APQ-00621-11), CNPq, and FAPESP grant number 10-50959-4 (to DSZ). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: silva_cv@yahoo.com.br

Introduction

Chagas disease is a chronic, systemic, parasitic infection caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. The disease affects about 8 million people in Latin America, of whom 30–40% either have or will develop cardiomyopathy, digestive megasyndromes, or both [1]. Knowledge of the pathology and immune response to *T. cruzi* infection has been largely obtained from murine models. These models have shown that the innate and adaptive immune responses play an important role in parasite control, depending on the combined action of various cellular types including NK, CD4+ and CD8+ as well as on the production of antibodies by B cells [2–5]. Resistance to *T. cruzi* infection has been associated with the production of the pro-inflammatory cytokines IL-12 and IFN- γ and with the local production of RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β and MCP-1. These cytokines activate the production of nitric oxide by macrophages, which is responsible for elimination of the parasite [6–9]. TNF- α has also been associated with macrophage activation as a secondary signal for nitric oxide production [10]. In contrast, cytokines such as IL-4 and TGF- β are associated with parasite susceptibility [11,12].

T. cruzi strains have been divided into six discrete typing units (DTUs) according to their genetic background. These groups are designated *T. cruzi* I to VI [13]. The geographical distribution of these groups indicate that *T. cruzi* II to VI are the main causal agent of Chagas' disease in the southern parts of South America, with *T. cruzi* I only present in the sylvatic cycle [13–15]. In contrast, in Colombia, Venezuela, and Central America *T. cruzi* I have been reported as the primary parasite present in human cases [16–18].

T. cruzi G strain (obtained from Nobuko Yoshida and originally from Mena Barreto), isolated from an opossum in the Amazon region, belongs to genotype I and shows a particular behavior; Metacyclic trypomastigotes from G strain show low infectivity *in vitro* and no *in vivo* parasitemia [19]. This phenotype was attributed to the expression of a glycoprotein GP90, a stage specific negative modulator of cell invasion [20]. Conversely amastigotes from G strain are highly infective *in vitro* [21,22] but do not sustain a patent infection *in vivo* (data not published), regardless that amastigotes and blood stream trypomastigotes are the main forms encountered during the disease progression. Indeed, the presence of blood stream trypomastigotes reflects the full completion of the

Author Summary

Trypanosoma cruzi, an obligate intracellular protozoan, is the etiological agent of Chagas disease that represents an important public health burden in Latin America. The infection with this parasite can lead to severe complications in cardiac and gastrointestinal tissue depending on the strain of parasite and host genetics. Currently, six genetic groups (*T. cruzi* I to VI) have been identified in this highly genetic and diverse parasite. The majority of published data concerning host immune response has been obtained from studying *T. cruzi* II to VI-infected mice, and the genetic differences between *T. cruzi* II to VI and *T. cruzi* I strains are large. Here we aimed to understand how amastigotes from *T. cruzi* I G strain are highly infective *in vitro* and do not contribute for a patent parasitemia *in vivo*. Our results showed that amastigotes from G strain are highly susceptible to IFN- γ treatment *in vitro* and secretion by immune cells *in vivo*. This information may represent important findings to design novel immune strategies to control pathology that may be caused by different strains in the same host.

developmental parasite life cycle program otherwise known to proceed in the most frequent conditions. These results raised questions that remained to be addressed along the past years. How come amastigotes from G strain are highly infective *in vitro* and do not contribute for a patent infection *in vivo*? How would the host respond to the infection that complete abolishes parasitemia? Thus, to gain insight concerning this issue we performed this study that provided us a unique result; IFN- γ production *per se* is sufficient to control infection by G strain amastigotes. It is extensively known the role of IFN- γ in controlling intracellular parasite infection [23–26]. However it is completely new for us that this cytokine is unique in controlling infection by *T. cruzi* G strain. It is generally observed that *T. cruzi* strains are sensible to most of immune response mechanisms and also that are able to overcome these responses establishing an acute phase characterized by parasitemia and animal death [6–9]. Indeed, this is the first report which showed that the traditionally well known immune response mechanism based on IFN- γ production is sufficient to control infection by low virulent *T. cruzi* G strain.

Methods

Animals

Female wild type BALB/c and C57BL/6 mice and also, iNOS, Nod2, Myd88, IL-12p40, TNF- α , IFN- γ , CD4, CD8, IL-18, gp91 phox subunit of NADPH oxidase knockout (KO) were provided and maintained at the animal facilities of the Department of Biochemistry and Immunology, School of Medicine of Ribeirão Preto, USP (Ribeirão Preto, Brazil). Male or female mice were six to eight weeks old and were kept under standard conditions on a 12-h light, 12-h dark cycle in a temperature-controlled room ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) with food and water *ad libitum*. Maintenance and care of these animals complied with the guidelines of the Laboratory Animal Ethics Committee from the Institution. Animal euthanasia was performed in accordance with international welfare grounds, according to the American Veterinary Medical Association Guidelines on Euthanasia.

Parasites and cells

T. cruzi from G was maintained in Vero cells culture. To obtain the amastigotes forms, trypomastigotes were incubated in LIT

medium (liver infusion tryptose), pH 5.8 overnight. Vero, HeLa and MEF (murine embryonic cells) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) with L-glutamine and Dglucose (4500 mg/L), sodium bicarbonate (2000 mg/L), HEPES (2380 mg/L), sodium pyruvate (1100 mg/L), supplemented with Fetal bovine serum (10%) and Penicillin (60 mg/L), gentamicin (40 mg/L) and streptomycin (10 mg/L). Cells were grown at 37°C with 5% CO_2 in cell plates.

In vitro multiplication assay

HeLa and MEF cells were plated into 24 wells plate (10^5 cells/well). Each well contained a 13 mm round coverslips and were left overnight. After, amastigotes from G (20 parasites/cell) strain were put in contact with cells for 3 hours. After, wells were washed three times with PBS to remove non-internalized parasites. 3 and 48 hours post-infection cells were fixed with Bouin solution and Giemsa stained. Then, coverslips were glued onto glass slides. Number of internalized parasites and multiplication were counted in a total of 100 infected cells. The experiment was performed in triplicate and three times.

Ex-vivo multiplication assay in inflammatory peritoneal macrophages

Inflammatory peritoneal macrophages, from C57BL/6, were recruited with the injection of thioglycollate 3% (3 g/L). Two days after, animals were intraperitoneally injected with 10^5 amastigotes from G strain and macrophages extracted only after 3 hours. The cells were plated into 24 well plates (5×10^5 cells/well). Finally, cells were Bouin fixed and Giemsa stained, 48 and 72 hours post-inoculation and number of internalized parasites was counted in a total of 100 infected macrophages. The experiment was performed in triplicate and three times.

Release assay

Undifferentiated cells were extracted from C57BL/6 bone marrow. Primarily, the femur of mice was withdrawn and cells were extracted with a PBS squirt into the marrow. Afterwards, these cells were placed on a Petri dish with a medium containing 20% of fetal bovine serum and 30% of the supernatant of L929 cell line which secretes M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) a macrophage differentiated factor. Once differentiated, cells were plated in a 96 well plate, some of them stimulated with 10 or 100 ng/mL of IFN- γ and others not. Subsequently, cells were infected with amastigotes from G strain (20 parasites/cell) and the release of trypomastigotes was observed over ten days.

Parasitemia and mortality analysis

BALB/c, C57BL/6 and iNOS, TNF- α , IL-12p40, IL-18, CD4, CD8, IFN- γ and gp91 phox subunit of NADPH oxidase KO animals were intraperitoneally inoculated with 10^5 amastigotes from G strain. Each group was composed of five animals. Blood was collected from animal orbital plexus and 5 μL was placed on a slide to parasitemia analyses. Parasitemia and animals mortality was observed over thirty days post-inoculation.

Parasitemia and mortality analysis of inoculated and immunosuppressed mice

C57BL/6 mice were intraperitoneally inoculated with 10^5 amastigotes from G strain. Each group was composed of five animals. Ten days after inoculation, the animals were immunosuppressed with Decadron (dexamethasone) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The medication was added to the water bottle of the immunosup-

pressed groups. Control groups were given just water. Blood was collected from animal tail and 5 μ L was placed on a slide to parasitemia analyses. Parasitemia and animals mortality was observed over forty days post-inoculation.

Flow cytometry

C57BL/6 mice were intraperitoneally inoculated with 10^5 amastigotes from G strain. Each group was composed of four female animals. Control group was not infected. Blood was collected through orbital plexus at 8 and 25 days post-inoculation. Lymphocytes were separated from other blood cells using Ficoll-Paque™ gradient (Amersham Biosciences). Cells were washed with FACS buffer, counted, and 5×10^5 cells were labeled with CD16/32-APC and CD69-PE or NK1.1-PE (BD). NK1.1 is a surface molecule expressed in NK cells in selected strains of mice, including C57BL/6 (an specific marker); CD16 and/or CD32 are expressed on NK, monocytes, macrophages, dendritic cells, kupffer cells, granulocytes, mast cells, B lymphocytes, immature thymocytes and some activated mature T lymphocytes (here an unspecific marker); CD69 is expressed upon activation of lymphocytes (T, B, NK, and NK-T cells), neutrophils and macrophages, also on IL-2 activated NK cells (an activation marker). The samples were acquired by FACSCantoII (BD), and the results were analyzed by FlowJo software (version 7.6.3).

Statistical analyses

The significance of experiments was determined by one way ANOVA performed according to VassarStats program (Richard Lowry 1998–2006), available <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html> or by GraphPad Prism program, version 5.01 for Student-t analysis. The results were considered significant when $p < 0.05$. The mortality analysis was performed by a survival curve according to GraphPad Prism program.

Results

Amastigotes from G strain provided a patent *in vitro* infection. On the other hand, was rapidly controlled *in vivo* but was not completely eliminated

Invasion assays using amastigotes from G strain were performed during 3 hours and the multiplication verified 48 h post HeLa and MEF cells invasion. The results showed that G strain amastigotes showed high invasion and multiplication indexes in both mammalian cell lines (Figure 1 A and B). Also, 80 to 90% of cells were infected by the parasite. However, when BALB/c and C57BL/6 mice were intraperitoneally inoculated with amastigotes from G strain, no parasitemia was observed in both animal models (Figure 1 C). One could argue that this *T. cruzi* strain would be non-virulent. Nonetheless, in immunosuppressed C57BL/6 animals, parasitemia reached high peak after 24 days post-inoculation (Figure 1 D).

IFN- γ controls G strain amastigotes infection

In order to verify the impact of different host immune components in protection against infection by amastigotes from *T. cruzi* G strain we performed a screening using different knockout mice model. First, we inoculated Myd88, Nod2, CD4 and CD8 KO animals. The results showed no change in the course of infection and mortality comparing to WT mice (Figure 2 a, b, c, d, e, f, g, and h). After, we verified if cytokines would play any role in animal protection against amastigotes from *T. cruzi* G strain infection. In this sense, we used TNF- α , IL-18, IL-12 and IFN- γ KO mice. We observed that deficiency on TNF- α and IL-

18 secretion did not have impact on parasitemia and animal survival (Figure 3 b, c, f and g). On the other hand, IL12p40 KO mice showed parasitemia on the 12 day post-inoculation ($p < 0.01$) and 40% of mortality by the 30 post-inoculation ($p < 0.01$) (Figure 3 a and e). Moreover, IFN- γ KO mice presented a high parasitemia peak by the 16 day post-inoculation ($p < 0.001$) and all animals died by the 24 day ($p < 0.01$) (Figure 3 d and h). These results turned our attention to the role of macrophages during *T. cruzi* G strain clearance. To gain insight about this issue, we performed an *ex vivo* assay. For that purpose, C57BL/6 mice were intraperitoneally inoculated with amastigotes from G strain for 3 h. Inflammatory peritoneal macrophages were collected and seeded into coverslips. After 48 and 72 h of culture the number of intracellular amastigotes was counted. It was observed that G strain amastigotes did not multiply intracellularly in the macrophage cultures (Figure 4 A). Moreover, naive macrophages obtained from C57BL/6 mice bone marrow undifferentiated cells were *in vitro* infected with amastigotes from G strain and the number of trypomastigotes in the supernatant was counted after three, five and seven days of infection and treatment or not with different concentrations of IFN- γ . The number of trypomastigotes from G strain in the supernatant was higher in non-treated cells ($p < 0.001$), showing that naive macrophages could not impair parasite multiplication and differentiation. However, the number of released parasites was dramatically reduced in treated cells in an IFN- γ dose dependent manner (Figure 4 B). The next step was to identify the mechanism activated by macrophages during parasite clearance. For that purpose we inoculated amastigotes from G strain in iNOS and gp91 KO mice. However, the results showed no difference in the course of infection, neither on the mortality rates (Figure 5 a, b, c and d).

NK cells are recruited early during infection by G strain amastigotes

One important question raised by our results is the source of IFN- γ , since CD4 and CD8 cells seemed not to play an important role. Also, it is worth mentioning that the control occurred during the first days after inoculation. Thus, we performed flow cytometry in order to verify if NK cells were recruited during infection. The results showed that in non inoculated animals the lymphocytes population in peripheral blood were stained neither for CD16/32 nor for NK1.1 and CD69, indicating a phenotype of inactivated T cells (Figure 6 b and c). However, when we observed the animals by 8 days post-inoculation, we were capable of identifying another distinct cell population, which was denominated of “large granular lymphocytes” (LGL). It is known that the NK cells are largest than other lymphocytes and they have granular contents. Thereby, this LGL population had the same NK cells phenotype. We observed that this population was mostly double positive to CD16/32 and NK1.1 (Figure 6 d') or CD69 (Figure 6 e'), confirming NK phenotype, and that they were activated. Afterward, our results demonstrated a dramatic increase in activated NK cell by the 8 day post-inoculation ($p < 0.001$) (Figure 6 a', d', and e'), however this behavior was not maintained in 25 day post-inoculation, returning to basal levels (Figure 6 a" d" and e").

Discussion

T. cruzi is a very heterogeneous flagellate parasite; and its populations are characterized by a diverse morphology, a heterogeneous biological behavior, a high genetic variability, and distinctly different clinical courses. The clonal-histotropic model of Chagas' disease [27] describes a correlation between the clonal-population structure of *T. cruzi* and its tissue tropism; and it gives a

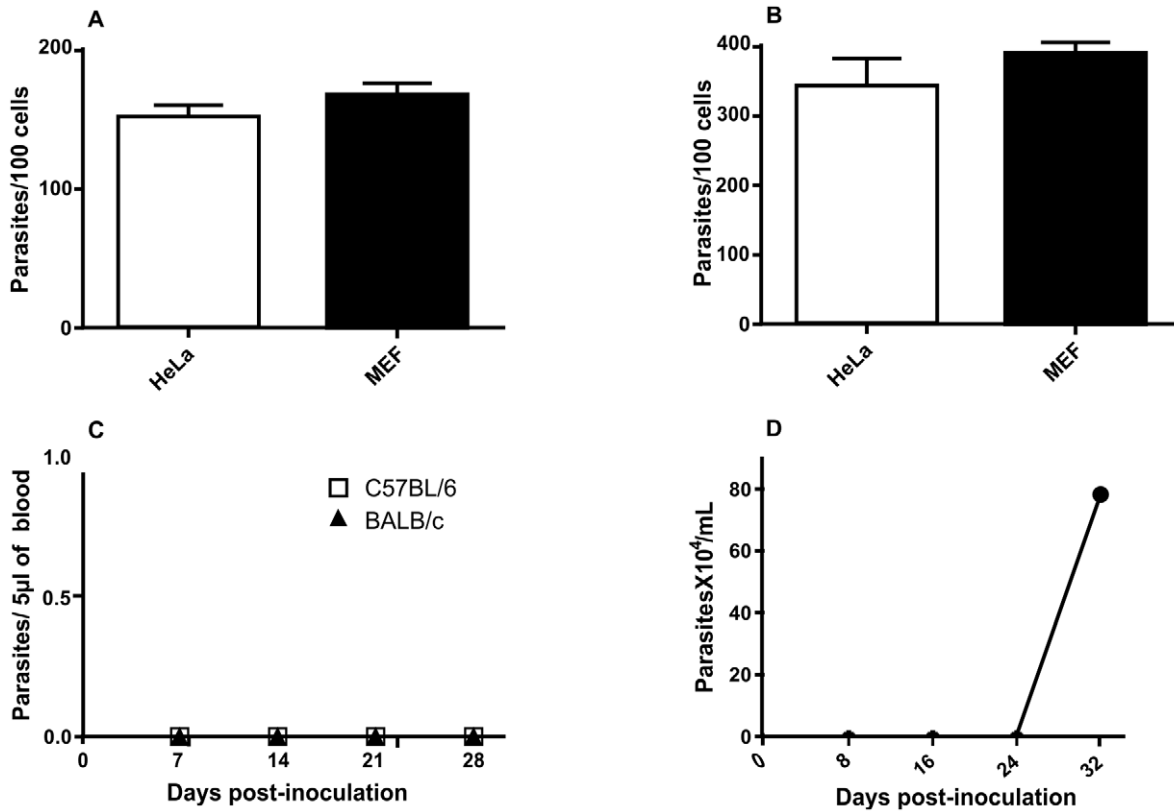


Figure 1. G strain parasitemia is only detected after dexamethasone treatment. G strain amastigote progeny is generated in HeLa and MEF cells *in vitro* but no trypomastigotes are released at a detectable level in the bloodstream in C57BL/6 mice except if the latter are given dexamethasone. Amastigotes from G strain invasion (A) and multiplication (B) in HeLa and MEF cells. Parasitemia was not observed in wild type C57BL/6 and BALB/c mice (C). C57BL/6 mice that were given 100,000 amastigotes intraperitoneally at day 0 and that were given dexamethasone from day 10 onward displayed parasitemia from days 24 post amastigote inoculation (D). * $p < 0.001$. doi:10.1371/journal.pntd.0001598.g001

possible explanation for the variety shown by this parasite. It is now accepted that *T. cruzi* strains can be divided into six DTUs, *T. cruzi* I to VI [13].

To our awareness this is the first study that evaluated the immune response against *T. cruzi* amastigotes from strain belonging to group I. In this context, understanding the way host responds to amastigotes is quite important, once amastigotes are the main forms encountered during the chronic phase of the disease. Our first observation is that infection by amastigotes from G strain did not activate signal pathway dependent on Myd88 nor reliant on Nod2 receptor. Probably other innate immune response related receptors are triggered during amastigotes infection. This issue will be addressed in additional studies. Infection in other knockout animals showed that G strain amastigotes were only susceptible to IL-12 and IFN- γ production. The major cytokine responsible for IFN- γ secretion is IL-12. However we observed just a low peak of parasitemia in IL-12 KO mice. This result may be explained by the fact that IL-18 also induces IFN- γ secretion. Moreover, IL-18 KO mice showed no parasitemia. Thus, these results showed the redundant role of these cytokines in inducing IFN- γ production and infection control. A double knockout mice model for both cytokines would be helpful to sustain this hypothesis.

IFN- γ is an important mediator of resistance to *T. cruzi*. Besides iNOS, IFN- γ regulates the expression of a large number of genes, including chemokines and chemokine receptors, which were shown to play a role in IFN- γ mediated protection in *T. cruzi*

infection. Early during infection, IFN- γ is secreted by NK cells and other cell types, as part of the innate response, and later on the infection course by activated CD4+ and CD8+ T cells [23–25]. Recently, authors demonstrated for the first time *in vivo*, the specific importance of direct IFN- γ mediated activation of macrophages for controlling infection with multiple protozoan parasites [26]. Here we observed that IFN- γ plays crucial and unique role in controlling infection by amastigotes from *T. cruzi* G strain.

Nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) are two key inflammatory mediators involved not only in pathogen clearance but also in tissue injury. Nitric oxide is produced by different isoforms of NO synthase, among them the inducible isoform (iNOS) that is activated by IFN- γ and TNF- α [28]. During *T. cruzi* infection, NO can directly or indirectly modulate the effector leukocyte machinery through diverse mechanisms. This process involves microbicidal effects derived from toxic-free radicals (peroxynitrite and superoxide) generated after NO production, as well as regulation/enhancement of the inflammatory response induced during this type of infection, a dual role in the immunity that is usually observed for NO. This well-known immune duality is usually dependent on concentration and, once dysregulated, may lead to host cell toxicity, autoimmunity or parasite persistence due to immune evasion, all of which can lead to pathology. NO is involved in the control of *T. cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. NO affects *T. cruzi* by chemically modifying cysteine-containing proteins and/or

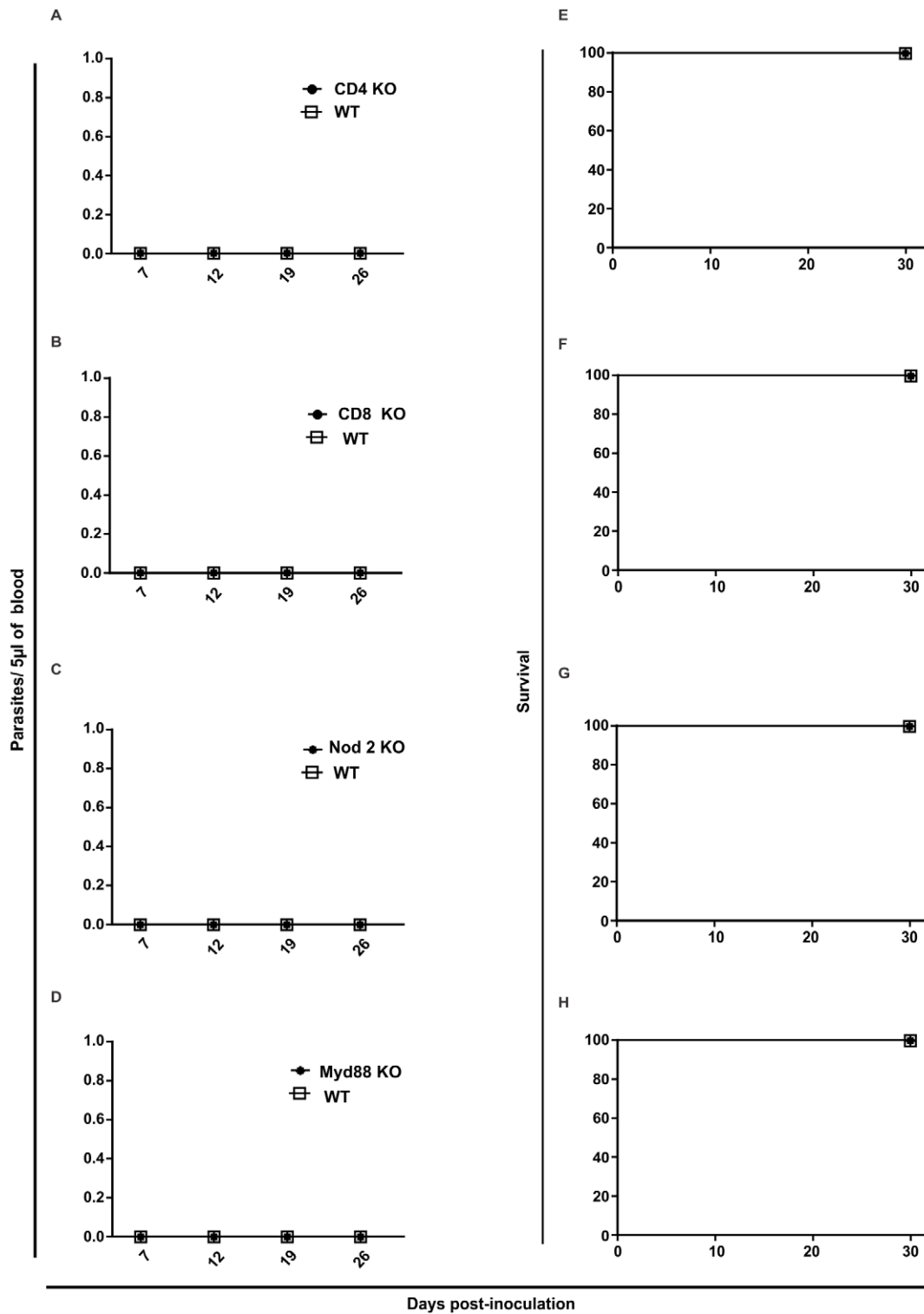


Figure 2. Whatever gene (CD4, CD8, Nod2 and Myd88) deletion, trypomastigotes were never detected in mice bloodstream. Wild type and CD4 (a, e), CD8 (b, f) Nod2 (c, g) and Myd88 (d, h) knockout mice were given intraperitoneally 100,000 G strain amastigotes. Parasitemia values were monitored in mouse blood at 7, 12, 19 and 26 days post-inoculation; survival was checked every day until 30 post-inoculation. (n = 5 mice per group).

doi:10.1371/journal.pntd.0001598.g002

by binding to metallo-proteins that mediate crucial metabolic processes. The strength of NO toxicity is dependent on the sensitivity of the parasite, which differs among parasite strains and

according to the physiological microenvironment [29]. Moreover, Oxidative burst of activated phagocytes results in the release of ROS, e.g., superoxide ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and

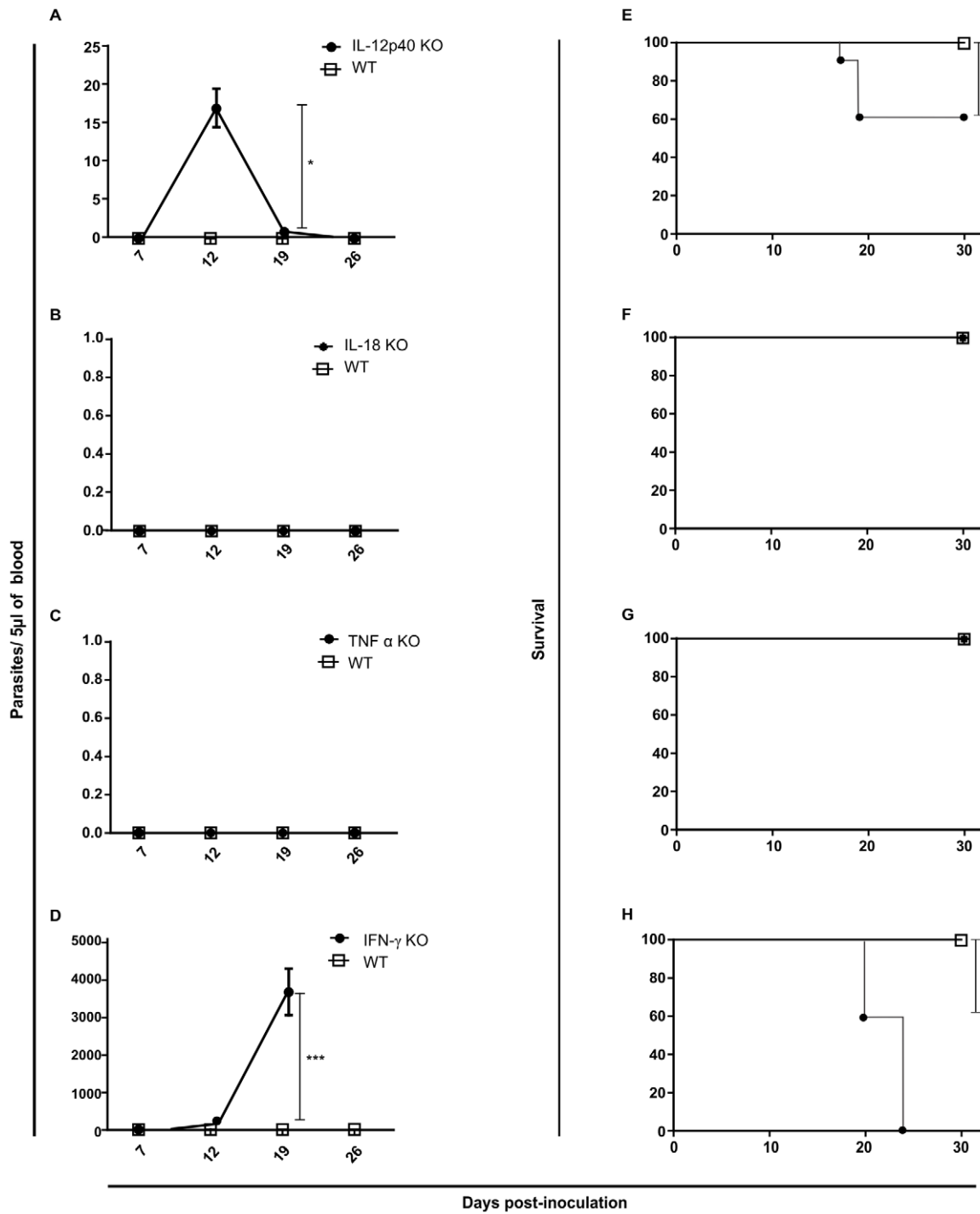


Figure 3. Deletion in IL12p40 and IFN- γ induced bloodstream parasitemia. Though with distinct profiles, in mice genetically deleted from either IL12p40, IFN- γ , the G strain trypomastigote progeny was detected in the bloodstream, while in mice deleted from either IL-18 or TNF- α , no trypomastigote progeny was detected. Wild type and IL-12p40 (a, e), IL-18 (b, f), TNF- α (c, g) and IFN- γ (d, h) knockout mice were given intraperitoneally 100,000 G strain amastigotes. Parasitemia values were monitored in mouse blood at 7, 12, 19 and 26 days post-inoculation; survival was checked every day until 30 post-inoculation. (n = 5 mice per group). It was observed parasitemia peak and mortality only for IL-12p40 and IFN- γ KO mice. *p<0.01; ***p<0.001.

doi:10.1371/journal.pntd.0001598.g003

hydroxyl radical, via activation of NADPH oxidase (NOX) and/or myeloperoxidase (MPO) enzymes. The inflammatory cytokines and ROS are important for the control of *T. cruzi* and may be cytotoxic to the host cellular components. Many of the ROS are highly reactive and diffusible and may be released into the

extracellular milieu. Whereas intracellular ROS serve mainly for host defense against infectious agents, the extracellular release of ROS, when present in abundance, directly damages the surrounding tissues or promotes inflammatory processes (revised in [30]). Our results obtained from iNOS and gp91 KO mice

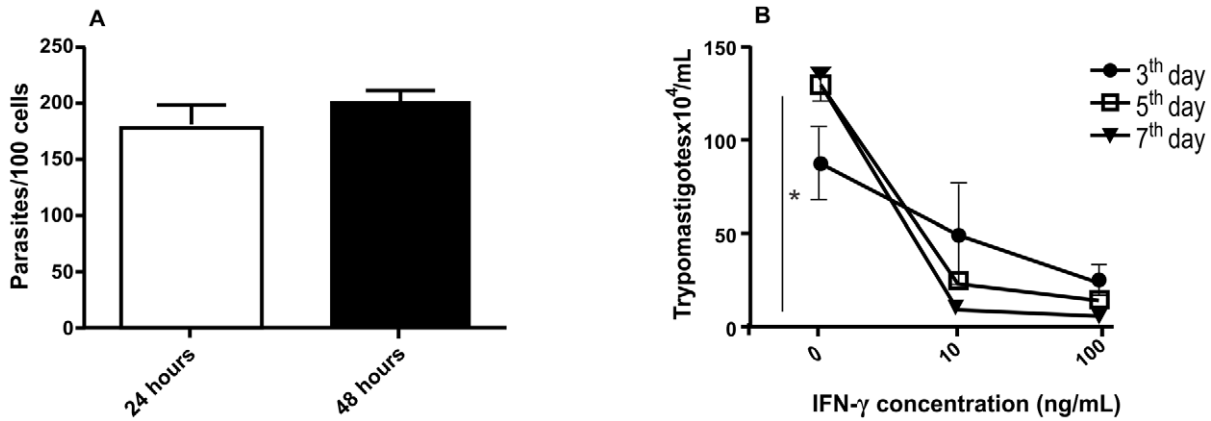


Figure 4. Inflammatory and IFN- γ treated naive macrophages impaired cell-cycling trypomastigotes differentiate from amastigotes. Amastigotes did not multiply in inflammatory peritoneal macrophages in an *ex-vivo* assay (A). Treatment with recombinant IFN- γ controlled in a dose dependent manner trypomastigotes release from bone marrow derived naive macrophages (B) ($p < 0.001$). doi:10.1371/journal.pntd.0001598.g004

showed no parasitemia during the 30 days post-inoculation. Thus, is conceivable to believe that NO and ROS may play redundant role during parasite clearance. Another hypothesis that does not completely exclude the first is that other mechanisms of parasite clearance would be activated by G strain parasites, such as a group of IFN- γ induced genes that plays a major role in host control of intracellular pathogens. These genes belong to a family encoding a series of 47- to 48-kDa GTPases for instance LRG-47 that can influence *T. cruzi* Y strain control by

simultaneously regulating macrophage-microbicidal activity and hemopoietic function [31].

Our results showed the impact of innate immune response in controlling infection by amastigotes from G strain. In addition, CD4 and CD8 KO mice showed no difference in the infection course. This information may represent important finding to design novel immune strategies focused on enhancing the innate immune response to control pathology that may be caused by different strains of the parasite in the same host.

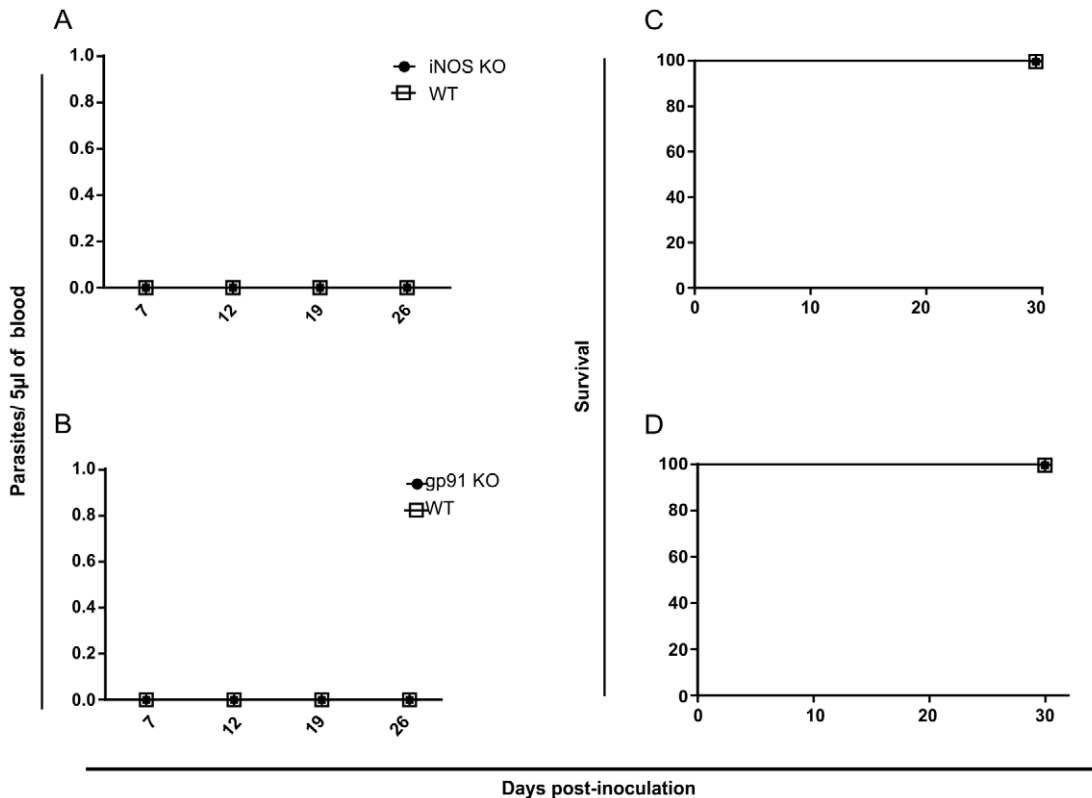


Figure 5. In iNOS and gp91 KO mice no trypomastigote progeny was detected. Wild type, iNOS (a, c) and gp91 KO (b, d) mice were given intraperitoneally 100 000 G strain amastigotes. Parasitemia values were monitored in mouse blood at 7, 12, 19 and 26 days post-inoculation ; survival was checked every day until 30 post-inoculation . (n = 5 mice per group). doi:10.1371/journal.pntd.0001598.g005

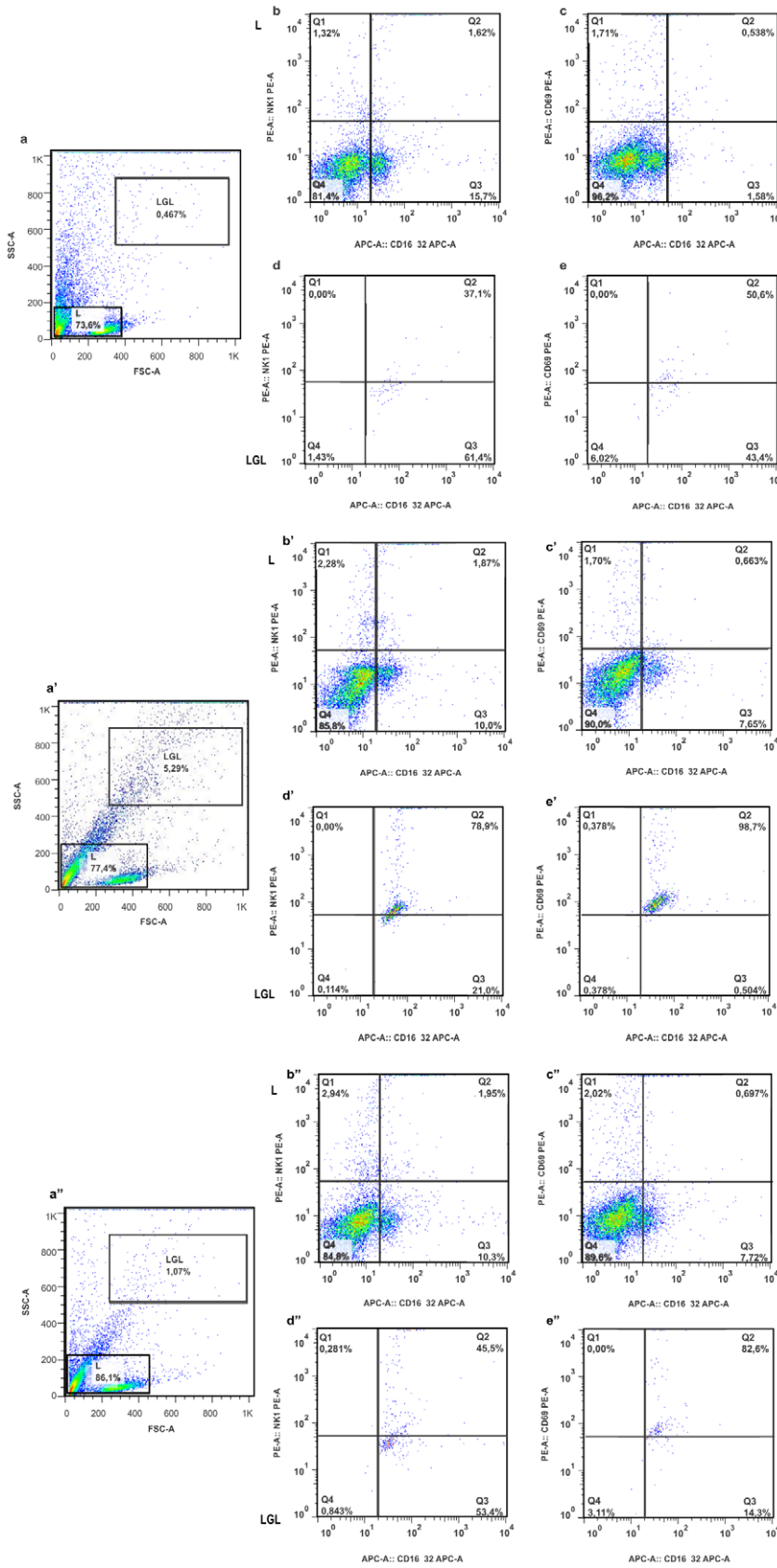


Figure 6. Monitoring presence of activated NK cells in bloodstream post amastigote intraperitoneal inoculation. Flow cytometry was performed with mononuclear cells prepared from mice left without any inoculation (a, b, c, d and e), and mice that were given intraperitoneal G strain amastigotes at day-8 post-inoculation (a', b', c', d' and e') at day-25 (b'', c'', d'' and e''). Note the higher percentage of activated NK cells at day-8 post-inoculation ($p < 0.01$). Gates: L – lymphocytes and LGL – large granular lymphocytes (NK cells). doi:10.1371/journal.pntd.0001598.g006

To gain insight into the source of IFN- γ production, we performed flow cytometry and observed that the lymphocyte population in the peripheral blood samples showed an inactivated phenotype in infected and non infected animals. While in infected animals, we observed a significant increase in NK population with an activated phenotype. This result suggested that the main source of IFN- γ produced to protect animal against amastigotes from *T. cruzi* G strain is NK cells. However, depletion of NK cell in WT and IFN- γ KO mice would be interesting to confirm the hypothesis.

In conclusion, our research showed that although amastigotes from G strain were highly infective *in vitro* they did not induce a patent infection *in vivo* due to the high susceptibility to IFN- γ production early in infection. This study highlighted the need to

consider strain biases when investigating host immune response against *T. cruzi*.

Acknowledgments

We would like to thank Deivid Willian da Fonseca Batistão, Msc, for the assistance in flow cytometry analysis, and Paula Brígido for assistance in images processing.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CVS AAR DSZ JSS EAVF. Performed the experiments: AAR JSS GKS FAM AAS CPSSN CVH. Analyzed the data: CVS AAR. Contributed reagents/materials/analysis tools: CVS DSZ JSS. Wrote the paper: CVS.

References

- Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA (2010) Chagas disease. *The Lancet* 375: 1388–1402.
- Brener Z, Gazzinelli RT (1997) Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol* 114: 103–110.
- Dos Reis GA (1997) Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Today* 13: 335–342.
- Kayama H, Takeda K (2010) The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect* 12: 511–517.
- Dos Reis GA (2011) Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease. *Braz J Med Biol Res* 44: 84–90.
- Aliberti JCS, Cardoso MAG, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, et al. (1996) Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infection and Immunity* 64: 1961–1967.
- Aliberti JCS, Machado FS, Souto JT, Campanelli AP, Teixeira MM, et al. (1999) β -Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity* 67: 4819–4826.
- Antúnez MI, Cardoni RL (2000) IL-12 and IFN- γ production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunology Letters* 71: 103–109.
- Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JC, Michailowsky V, Santos PV, et al. (2000) Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN- γ as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and Infection* 2: 851–866.
- Abrahamsohn IA, Coffman RL (1996) *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Experimental Parasitology* 84: 231–244.
- Rodrigues MM, Ribeiro M, Boscardin SB (2000) CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. *Immunology Letters* 73: 43–50.
- Hiyama K, Hamano S, Nakamura T, Nomoto K, Tada I (2001) IL-4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Research* 87: 269–274.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, et al. (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends *T. cruzi* I to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1051–1054.
- Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, Almeida IC, Frasch ACC (2002) A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *Journal of Experimental Medicine* 195: 401–413.
- Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, et al. (1999) The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology* 118: 161–166.
- Añez N, Crisante G, da Silva FM, Rojas A, Carrasco H, et al. (2004) Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Tropical Medicine and International Health* 9: 1319–1326.
- Black CL, Ocaña S, Rimer D, Costales JA, Lascano MS, et al. (2007) Household risk factors for *Trypanosoma cruzi* seropositivity in two geographic regions of Ecuador. *Journal of Parasitology* 93: 12–16.
- Mejía-Jaramillo AM, Peña VH, Triana-Chávez O (2009) *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of lineages I and II supports the predominance of lineage I in Colombia. *Experimental Parasitology* 121: 83–91.
- Yoshida N (1983) Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity* 40: 836–839.
- Yoshida N, Blanco SA, Araguth MF, Russo M, González J (1990) The stage-specific 90-Kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 39: 39–46.
- Silva CV, Luquetti AO, Rassi A, Mortara RA (2006) Involvement of Ssp-4-related carbohydrate epitopes in mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Microbes and Infection* 8: 2120–2129.
- Silva CV, Kawashita SY, Probst CM, Dallagiovanna B, Cruz MC, et al. (2009) Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. *Microbes and Infection* 11: 563–570.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A (1992) The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol* 22: 2501–2506.
- Hölscher C, Köhler G, Müller U, Mossmann H, Schaub GA, et al. (1998) Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun* 66: 1208–1215.
- Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, et al. (2001) Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 158: 1433–1440.
- Lykens JE, Terrell CE, Zoller EE, Divanovic S, Trompette A, et al. (2010) Mice with a selective impairment of IFN-gamma signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN-gamma-activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections *in vivo*. *J Immunol* 184: 877–885.
- Padilla AM, Bustamante JM, Tarleton RL (2009) CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Curr Opin Immunol* 21: 385–390.
- Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907–916.
- Gutierrez FRS, Mineo TWP, Pavanelli WR, Guedes PMM, Silva JS (2009) The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 236–245.
- Gupta S, Dhiman M, Wen JJ, Garg NJ (2011) ROS signalling of inflammatory cytokines during *Trypanosoma cruzi* infection. *Adv Parasitol* 76: 153–70.
- Santiago HC, Feng CG, Bafica A, Roffe E, Arantes RM, et al. (2005) Mice Deficient in LRG-47 Display Enhanced Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* Infection Associated with Defective Hemopoiesis and Intracellular Control of Parasite Growth. *J Immunol* 175: 8165–8172.

5.0- ARTIGO 2- KC expression. Correlated to *Trypanosoma cruzi* *in situ* control upon oral infection

KC expression correlated to *Trypanosoma cruzi in situ* control upon oral infection

Adele A. Rodrigues, Ana Flávia O. Notário, Thaise L. Teixeira, Rebecca T. e Silva, Amanda P. N. Quintal, Rosiane N. Alves, Paula C. Brígido, Carla S. Siqueira, Fabiana Silva, Flávia A. Martins, Fabrício C. Machado, Tatiana M. Clemente, Aline A. da Silva, Bruna C. Borges, Samuel C. Teixeira, Marlus A. dos Santos, Claudio V. da Silva*

Laboratório de Tripanosomatídeos, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

*Corresponding author:

Claudio Vieira da Silva, PhD

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas

Laboratório de Tripanosomatídeos

Av. Amazonas, Bloco 6T sala 07

Campus Umuarama, Uberlândia, MG, Brazil

e-mail: silva_cv@yahoo.com.br

phone: +553432182549

ABSTRACT

T. cruzi presents a high biological, biochemical, tissular tropism diversity. Here we aimed to verify different aspects of non-virulent and virulent *T. cruzi* strains upon oral infection in a kinetics experimental murine model. It was observed that during acute infection higher concentration of parasites were found from both strains in the stomach. Parasites from CL strain seemed not to migrate and perpetuate in this tissue at chronic phase. Conversely, a progressive heart infection by G strain was observed, which also remained in stomach. In spleen, were detected low amount of parasites from both strains. We have observed that during CL strain infection high amounts of KC were detected in cardiac tissue. On the other hand, this phenotype was not observed upon G strain infection, that found a suitable environment to establish and or due to its low virulence, it may poorly active host immune response. In the spleen, the high presence of KC during acute phase may have controlled local infection by both *T. cruzi* strains. In this sense, we would like to propose the importance of studying the role of neutrophils and its chemo attractive KC chemokine during *T. cruzi* infection onset and development.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; immune response, cytokines, chemokines, KC, neutrophil

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of Chagas disease that affects about 10 million people worldwide, being endemic in Latin America. The increase in cases of Chagas disease in non-endemic areas, mainly due to immigration, blood transfusion, or organ transplantation, as well as its resurgence in endemic countries, has been a focus of attention in recent years (WHO, 2015; Emody, 2014; Andrade et al, 2014). Nowadays, oral infection with this protozoa represents the most frequently route of transmission in Brazil, being related to consumption of açai (*Euterpe oleracea*) palm fruit, as well as sugar cane juice (Nóbrega et al, 2009; Bastos et al, 2010; Andrade et al, 2014).

T. cruzi presents a high biological, biochemical, tissular tropism because of its genetic diversity (Vianna, 1911; Campos, 1927; Melo, Brener, 1978). This parasite is grouped into six discrete typing units (DTUs), *T. cruzi* I to VI, according to common genetic, molecular or immunological markers (Zingales, Andrade, Briones, 2009), which two of them were used: the G strain (*T. cruzi* I) and CL strain (*T. cruzi* VI). *T. cruzi* G strain presents a low infectivity *in vitro* and no *in vivo* parasitemia (Yoshida, 1983), due to the higher expression of the glycoprotein GP90, a stage specific negative modulator of cell invasion (Yoshida, 1990) and also due to its higher susceptibility to the host immune response, mainly due to IFN- γ secreted by natural killers (NK) cells at earlier time points of infection (Rodrigues et al., 2012). Differentially, *T. cruzi* CL strain is highly infective *in vitro* and *in vivo* (Teixeira, Yoshida, 1986).

The immune response developed by infected mammalian host, also impacts on the disease progression and clinical manifestations. The immunological events during the acute phase will influence disease outcome during the chronic phase, determining whether will remain in the asymptomatic form or progress to the cardiac or digestive clinical form of the disease. Most individuals in the chronic phase remains in the indeterminate clinical form (Dutra et al, 2009). This has been associated with predominant production of regulatory cytokines such as IL-10. A balance between inflammatory and anti-inflammatory cytokines plays key role in providing an effective cellular response that control parasite levels and also avoid tissue damage (Andrade et al, 2014). Here we aimed to verify different aspects of non-virulent and virulent *T. cruzi* strains infection outcome upon oral inoculation in a kinetics designed experimental murine model.

RESULTS

Parasite tissue tropism along infection upon oral inoculation

Based on qPCR analysis, it was observed that the infection was dependent of tissue and the time of infection for both strains. During acute infection (3 hours, 5 days and 15 days post inoculation), was found higher copies of parasite DNA from both strains in the stomach (Figure 1A). During the chronic phase (3 and 6 months post inoculation), high amounts of CL strain DNA was found in the stomach at both time points. On the other hand, G strain DNA was observed only at six months post infection (Figure 1A)

Curiously, parasites from CL strain (virulent) seemed to migrate but not to perpetuate patent infection in heart tissues. Conversely, it was clearly observed a progressive heart infection by G strain (non-virulent) from 15 days to 6 months post infection (Figure 1B). Low amounts of parasite DNA from both strains was detected in spleen samples (Figure 1C).

Tissue inflammation of mice orally infected by *T. cruzi*

Analysis of HE stained slides containing stomach, heart and spleen samples showed a progressive inflammation during all time points, regardless the amounts of parasite DNA detected in each organ and the parasite strain (Figure 2). Surprisingly, stomach was the organ with the lower inflammatory score despite being the organ of continuous permanence of the virulent CL strain. Representative image shows a prominent edema, characterized in voids between the cells previously occupied by liquid. Furthermore, there is great change in the morphology of the tissue in relation to the tissue of an uninfected animal (Figure 2A).

In the cardiac tissue, we observed a significant increase in the inflammatory process at chronic phase, compared to acute phase, especially for G strain ($p < 0.0001$). As shows the representative image, it is observed an intense focus of recruited inflammatory in heart tissue of animals infected with G strain at 6 months p.i. (Figure 2B). Spleen, as already expected, was the organ with the highest inflammatory score ($p < 0.0001$). It can be seen prominent edema in CL infected animals (Figure 2C).

Cytokines detection during the kinetics of mice orally infected by *T. cruzi*

The cytokines and chemokines detection in stomach showed that, during the acute phase, IL-12, TNF- α , eotaxin, MIG and IP-10 were highly detected in animals infected with G strain. On the other hand, infection with CL strain let to an increase in IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-10, MIP-1 β , IL-3 levels. During chronic phase, IFN- γ , KC, RANTES and M-CSF were increased in animals infected with G, and IL-12, TNF- α , MIP-1 β , KC, RANTES, MIP-1 α , MIG, IP-10, G-CSF, M-CSF, IL-2 and IL-7 increased in animal with CL strain (Figure 3 and 4).

In general, most of cytokines were downregulated in cardiac tissue. In cardiac tissue, the cytokines and chemokines highly expressed during the acute phase were: IL-10, KC, RANTES, MIG, IP-10 in animals infected with CL strain. At chronic phase, an increased expression of IL-12, IL-10, RANTES, MIG, IP-10 was observed in animals infected with CL. Animals infected with G displayed increased secretion of IL-10, RANTES, MIG, IP-10, M-CSF only during chronic phase. (Figure 5 and 6).

High cytokines and chemokines detection in spleen during the acute phase of CL infected mice were: IL-12, IL-5, IL-10, KC, GM-CSF and IL-7. During chronic phase, TNF- α , IL-5 IL-9, KC, IP-10, IL-2 and IL-3 (slightly increased, no significant) increased in animals infected with G, and IFN- γ TNF- α , IL-6, IL-4, IL-9, MIP-1 β , MIP-1 α , MIG, IP-10, GM-CSF, IL-2, IL-3 (slight increased, no significant), IL-7 increased in animals with CL strain (Figure 7 and 8).

IL-13 and IL-15 cytokines were not detected in any of the organs. LIF and IL-17 were detected only at low concentrations in the heart tissue. Actually, IL-17 was detected only in control animals (not infected), and is down regulated, being not detected in the heart of animals infected with both strains. IL-1 β was detected only in spleen from animals infected with CL strain, at the acute phase (3h), however in higher concentrations ($p < 0.0001$) at the chronic phase (6M). The chemokines MCP-1 and MIP-2 were detected only in the stomach, having increased MCP-1 during CL strain infection at acute phase (five days) compared to G strain infection ($p < 0.0001$). This chemokine was detected ($p < 0.0001$) only during the chronic phase of G strain (three and six months). MIP-2 was high (***) during acute infection by G (3h and 5D). Infection by CL showed lower concentrations of this chemokine, only at 3 h p.i. (data not shown).

DISCUSSION

A remarkable feature of *T. cruzi* is its heterogeneity in relation to biological properties, being reported differences in growth rates, infectivity, tissue tropism, antigenic composition, virulence, morbidity in animal models and susceptibility to immune response and chemotherapeutic drugs in distinct parasite isolates (Andrade et al. 1975; 1985; Brener et al. 1976; De Castro, De Meirelles 1987; Melo, Brener 1978; Neal, Van Bueren 1988; Roval et al. 1990). In humans, this heterogeneity among *T. cruzi* isolates and differences in the immune response of the host, can lead to a variable spectrum of clinical presentations in Chagas disease (Brener 1980; Montamat et al. 1999).

Upon oral infection, stomach seemed to be a highly susceptible organ for the establishment of both strains. Considering the infective CL strain, despite the high levels of pro-inflammatory cytokines secreted in stomach, we observed also increased expression of anti-inflammatory and regulatory cytokines (IL-4 and IL10). Moreover, the expression of IL-4 and IL-10 may have turned the hostile environment produced by inflammatory cytokines into a favorable niche for parasite replication. IL-4, produced mainly by activated T cells and also by mast cells, basophils, eosinophils (Nelms et al, 1999; Luzina et al, 2012). It is best known for defining the Th2 phenotype of lymphocytes and for regulating cell proliferation, apoptosis, and expression of numerous genes in various cell types, including lymphocytes, macrophages, and fibroblasts, as well as epithelial and endothelial cells. (Kelly-Welch, Hanson, Keegan, 2005; Mueller et al, 2002; Kelly-Welch et al, 2003; Laporte et al, 2008; Luzina et al, 2012). IL-4 shares sequence homology, cell surface receptors, intracellular signaling, and partial functional effects on cells with IL-13 (Luzina et al, 2012). Specifically, IL-4 is more potent than IL-13 in inducing Th2 cell differentiation and IgE secretion from B cells. So, IL-13 was clearly weaker than its more famous cousin IL-4, and having no obvious independent identity (Grünig et al, 2012). Another important anti-inflammatory cytokine is IL-10, expressed by many cells of the adaptive immune system, including Th1, Th2 and Th17 cell subsets, Treg cells, CD8+ T cells and B cells (reviewed in O'Garra, Vieira, 2007; Trinchieri, 2007; Maynard, Weaver, 2008; Saraiva, O'Garra, 2010). It is also expressed by cells of the innate immune system, including dendritic cells (DCs), macrophages, mast cells, natural killer (NK) cells, eosinophils and neutrophils. Thus, IL-10 production seems to be associated with many immune cells,

confirming its crucial role as regulator of diverse immune responses, not only Th1 cell responses (reviewed in O'Garra, Vieira, 2007; Trinchieri, 2007) but also Th2 (Saraiva, O'Garra, 2010).

Taking into account G strain infection, the stomach seemed to be a perfect niche for this non-virulent strain. By the time points of chronic disease, we observed important attempts to control both parasite growths. Animals infected with CL strain sustained production of important pro-inflammatory cytokines and chemokine including KC, a neutrophil activating chemokine. However, this attempt may also have failed by the high amounts of IL-10 present in the microenvironment. This phenotype may have account for the important destruction of organ architecture observed in histological slides by the six months post-inoculation, which was likely produced by intense multiplication rather than strong host immune response.

Before discussing the immune response developed in heart and spleen from infected mice, it is worth mentioning the tissue tropism of each one of the strains used in our experimental approach. In this sense, authors have shown that CL strain was almost absent in spleen, liver, bone marrow and smooth muscle from hollow organs (Melo, Brener, 1978). This strain is considered a myotropic one which causes changes in atrial beta-adrenoreceptors (Pires, Pereira, 1987).

To our knowledge, there is no study elucidating the tropism of G strain. One unique study showed the detection of amastigotes in liver of infected mice during acute infection (Cruz et al., 2012). Taking in account the above mentioned information our results showed the presence of CL strain DNA up to three hours post-infection. Thus, our observation corroborated the literature data, concerning its tropism of CL strain to cardiac tissue. Also, we verified during G strain infection the same pattern of migration. However, intriguing questions are raised: Why and how CL strain was virtually controlled in its preferential organ? Why and how G strain evaded this control and established a detectable infection during the chronic disease?

By the look of cytokines and chemokines secretion, we observed that during CL strain infection high amounts of KC were detected in cardiac tissue. On the other hand, this phenotype was not observed upon G strain infection. Again, G strain found a suitable environment to establish and or due to its low virulence, it may have poorly activated host immune response. Similar results were observed in spleen. In this case, the high presence of KC during acute phase may have controlled local infection by both *T. cruzi* strains. Corroborating our hypothesis that KC may have a profound impact on

controlling parasite multiplication, at 3 months post infection, G strain DNA was not detected in stomach. This observation was followed by an increased level of KC in this organ at the same time point.

The fact of non-detecting parasite DNA did not mean that parasite was completely eliminated. We believe that parasite still persisted even in non-detectable levels and its persistence shall be the driving force for sustained immune response and high inflammatory score detected at the different sites along infection. It is worth mentioning that IFN- γ , highly detected in stomach during the acute CL infection, is a strong inhibitor of KC expression (Aliberti et al., 2001). This phenomenon may have facilitated CL strain infection in stomach from infected animals.

KC is a neutrophil recruiter chemokine. Neutrophils are involved in the initial steps of most responses to pathogens and are essential components of the innate immune response. Due to the ability to produce and release various soluble mediators, neutrophils may participate in the regulation of the inflammatory response. Little is known about the role of neutrophils during *T. cruzi* infection (Luna-Gomes et al., 2014). Authors have demonstrated an important role of neutrophils in controlling *Leishmania* spp. infection (de Souza et al., 2010). In this sense, we would like to propose and stress here the importance of studying the role of neutrophils and its chemoattractive KC chemokine during *T. cruzi* infection onset and development. Important novel findings may come along by turning attention to the phenomena observed in this study.

MATERIALS AND METHODS

Parasites

Trypomastigote forms of G (obtained from Nobuko Yoshida, 1983 and originally from Mena Barreto) and CL (Brener; Chiari, 1963) *T. cruzi* strains were maintained alternately in mice and *in vitro*, in Liver infusion tryptose (LIT medium containing liver infusion broth, tryptose, NaCl, Na₂HPO₄, KCl, glucose, supplemented with fetal bovine serum and hemin, pH 7,2). Epimastigotes from LIT were harvested by centrifugation at 4.000 RPM and incubated with Grace's medium, to obtain the

metacyclic trypomastigotes (MT), as previously described by Teixeira and Yoshida (1986).

Animals and Ethics

Female C57BL/6 mice, 6-8 weeks of age, were provided by Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) of Universidade de Campinas (UNICAMP, Campinas, Brazil). Animals were maintained at Centro de Bioterismo de Experimentação Animal (CEBEA) from Universidade Federal de Uberlândia (UFU, Uberlândia, Brazil) under standard conditions on a 12-h light, 12-h dark cycle in a temperature-controlled room ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) with food and water ad libitum. Maintenance and care of these animals complied with the guidelines of the Laboratory Animal Ethics Committee from the Institution. Animal euthanasia was performed in accordance with international welfare grounds, according to the American Veterinary Medical Association Guidelines on Euthanasia.

Animal oral infection

C57BL/6 mice were infected via oral gavage with 5×10^5 of MT from G or CL strains. Non infected animals were used as control. After 3 hours, one day, five days, 15 days, three months and six months, the animals were euthanized and their spleen, heart and stomach collected and processed to histological, qPCR and cytokine analysis.

Histological analysis

Spleen, heart and stomach that were collected from infected or non-infected animals were submerged in formaldehyde (4% in PBS), left for 48 hours and after submerged in alcohol 70%. Subsequently the organs were subjected to increasing concentrations of alcohol, for its dehydration, and xylene for diaphanization. At the end, the organs were putted into paraffin blocks and $5\mu\text{m}$ cuts were made, placed on slides and stained by hematoxylin-eosin for further analysis. The histopathologic analysis were made according to Santos Lima and Minoprio (1996), scores were ascribed according to the extent of inflammation (4- frequent and very intense; 3- frequent and

intense; 2-occasional and attenuated; 1- rare and weak; 0- absent). The histopathological findings that help to define the scores were: infiltrative focus; edema; amastigote nest; spleen white pulp morphology.

DNA extraction and Real-time PCR (qPCR)

A small fragment (≈ 25 mg) of spleen, heart and stomach was collected and frozen at -70°C . DNA was extracted using the *PureLink® Genomic DNA Kit* (Invitrogen, catalog number K1820-01) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the sample was digested with *PureLink® Genomic digestion buffer* and proteinase K at 55°C . After, it was added *RNase*, *PureLink® Genomic Lysis/binding buffer* and ethanol 96-100%. All this lysate was putted in a *PureLink® Spin column*, and it was made the washing step with wash buffer. Finally, the DNA was eluted from the column with *PureLink® Genomic elution buffer*. The amount and purity of the extracted DNA was determined by spectrophotometer (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis). The DNA extracted samples were subjected to qPCR reaction using the primers D71: AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3'-5' and D72: TTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3'-5', which amplify a region of the gene 24s ribosomal *T. cruzi* TcI (110pb) and TCII (125pb) (Souto, Zingales, 1993; Souto et al., 1996). For qPCR reactions with a final volume of 12.5 μL , 2 μL of DNA was added (~ 50 ng). We used the *SYBR® Green PCR Master Mix (2X) reagent* (APPLIED BIOSYSTEMS) containing *SYBR® Green Dye AmpliTaq Gold® DNA polymerase*, dNTPs with dUTP, passive reference Rox, with optimized buffer components, and 10 M of each primer (D71, and D72). Reactions were carried out in the platform *ABI7300 (APPLIED BIOSYSTEMS)* with the following program: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, 40 cycles at 95°C for 15 seconds, 58°C for 45 sec and 72°C for 30 seconds. After the final extension of PCR, the samples were subjected to temperature variation from 50 to 95°C with a gradual increase of 0.5°C/s to obtain the melting temperature (T_m) and non-specific products. The results were analyzed using the program *7300 System SDS Software* vs. 1.4. All DNA extraction and amplification reactions were performed with negative controls in place to detect contamination at any stage of the proceedings and with positive controls that gave reproducible results for all experiments. The standard curve was prepared from dilution of 10^{10} copies of DNA / μL (10^{10} - 10^5) from *T. cruzi* (strains G and CL) at 1 mg/mL

BSA (bovine serum albumin). For the calculation of dilutions was used tool *on line DNA copy number calculation* (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/copynumber/>). For each standard curve, the software SDS 7300 (*Applied Biosystems*) sought the best fit between the points, calculated the linear regression and provided the R², the *slope* (slope of the curve) and the *y-intercept*. R² measures how close the fit is between the linear regression of the standard curve and the individual Ct values of the standard samples (a value of 1 indicates a perfect adjust between linear regression and individual data). The *slope* indicates the efficiency of amplification for the test (a value of 3.32 is 100% efficiency), and the *y-intercept* indicates the expected value of Ct for a sample with quantity one. Using the *slope* it can be calculated the efficiency of each reaction, using the formula: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$ (APPLIED BIOSYSTEMS, 2012). The standard amplification curve, the linear regression curve and regression coefficient, and melting curve were at supplemental figure 1.

Cytokine detection

Fragments of spleen, heart and stomach were collected and placed on protease inhibitor solution (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets®, ROCHE, catalog number 11836170001) macerated and stocked at -70°C. Cytokines detection was performed by LUMINEX platform (LINCOpex Kits, Millipore) at Instituto Genese de Análises Científicas (São Paulo, Brazil). It was screening 31 cytokines among them IL-2, IL-4, IL-3, IL-7, IL-9, IL-12p40, IP-10, KC, MIP-1β, LIX, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, eotaxin, IL-1α, IL-1β, IL-5, IL-6, MIG, VEGF, IFN-γ, MIP-1α, MIG, RANTES, TNF-α, LIF, IL-17, IL-13, IL-15, MCP-1, MIP-2.

Statistical analyses

The significance of experiments was determined by one way ANOVA performed according to VassarStats program (Richard Lowry 1998–2006), available <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html> or by GraphPad Prism program, version 5.01 for Student-t analysis. The results were considered significant when p,0.05.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants and fellowships from CAPES (process number: 3038.005295/2011-40) and FAPEMIG (process number: APQ-00621-11). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

REFERENCES

ALIBERTI, J. C.; SOUTO, J. T.; MARINO, A. P.; LANNES-VIEIRA, J.; TEIXEIRA, M. M.; FARBER, J.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Pathol**, v. 158, n. 4, p. 1433-40, 2001.

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, issue 7, 2014.

ANDRADE, S. G.; FIGUEIRA, R. M.; CARVALHO, M. L, GORINI, D. F. Influência da cepa do *Trypanosoma cruzi* na resposta à terapêutica experimental pelo Bay 2502. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 17, p. 330-339, 1975.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B.; PONTES, A. L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. **Bull WHO**, v. 63, p. 721-726, 1985.

APPLIED BIOSYSTEMS, Real-Time PCR handbook. 2nd Edition, 2012.

BASTOS, C. J.; ARAS, R.; MOTA, G.; REIS, F.; DIAS, J. P. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, 2010.

BRENER, Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Adv Parasitol**, v. 18, p. 247-292, 1980.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 5, p. 220-224, 1963.

BRENER, Z.; COSTA, C. A.; CHIARI, E. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to active chemotherapeutic agents. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 11, p. 245-249, 1976.

CAMPOS, E. S. Estudos sobre uma raça neurotrópica de *Trypanosoma cruzi*. **Ann Fac Med**, v. 2, p. 197-201, 1927.

CRUZ, M. C. ; SOUZA-MELO, N.; SILVA, C. V. ; DA ROCHA, W. D. ; BAHIA, D.; ARAUJO, P. R. ; TEIXEIRA, S. M. R. ; MORTARA, RA . *Trypanosoma cruzi*: Role of δ -Amastin on Extracellular Amastigote Cell Invasion and Differentiation. **Plos One**, v. 7, p. 51804, 2012.

DE CASTRO, S. L.; De MEIRELLES, M. N. Effect of drugs on *Trypanosoma cruzi* and on its interaction with heart muscle cell “*in vitro*”. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 209-218, 1987.

DE SOUZA CARMO, E. V.; KATZ, S.; BARBIÉRI, C. L. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. **PLoS One**, v. 3, n. 5, 2010.

DUTRA, W. O.; MENEZES, C. A.; VILLANI, F. N.; DA COSTA, G. C.; DA SILVEIRA, A. B. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of

protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 208–218, 2009.

EMODY, L. Chagas disease, update on a migration related tropical disease in Europe. **WHO**, 2014.

GRÜNIG, G. CORRY, D. B.; REIBMAN, J.; WILLS-KARP, M. Interleukin 13 and the evolution of asthma therapy. **Am J Clin Exp Immunol**, v.1, n. 1, p. 20-27, 2012.

KELLY-WELCH, A. E.; HANSON, E. M.; BOOTHBY, M. R.; KEEGAN, A. D. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. **Science**, v. 300, p. 1527–1528. 2003.

KELLY-WELCH, A.; HANSON, E. M.; KEEGAN, A. D. Interleukin-13 (IL-13) pathway. **Sci. STKE**, 2005.

LAPORTE, S. L.; JUO, Z. S.; VACLAVIKOVA, J.; COLF, L. A.; QI, X.; HELLER, N. M.; KEEGAN, A. D.; GARCIA, K. C. Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. **Cell**, v. 132, p. 259–272, 2008.

LIMA, E. C. S.; MINOPRIO, P. Chagas' disease is attenuated in mice lacking gd T Cells. **Infection and Immunity**, v. 64, No. 1, p. 215–221, 1996.

LUNA-GOMES, T.; FILARDY, A. A.; ROCHA, J. D.; DECOTE-RICARDO, D.; LAROCQUE-DE-FREITAS, I. F.; MORROT A, BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIANETO, H. C.; DOSREIS, G. A.; NUNES, M. P.; FREIRE-DE-LIMA, C. G. Neutrophils increase or reduce parasite burden in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages, depending on host strain: role of neutrophil elastase. **PLoS One.**, v. 5, n. 9, 2014.

LUZINA, I. G.; KEEGAN, A. D.; HELLER, N. M.; ROOK, G. A. W.; SHEADONHUE, T.; ATAMAS, S. P. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives”. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 753, 2012.

MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A.; ESCARIO, J. A.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Strains. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 1, p. 53-59, 2001.

MAYNARD, C. L.; WEAVER, C. T. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. **Immunol. Rev.**, v. 226, p. 219–233, 2008.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of diferente *Trypanosoma cruzi* strains. **J Parasitol**, v. 64, p. 475-482, 1978.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **The Journal of Parasitology**, v. 64, No. 3, p. 475-482, 1978.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J Parasitol**, v. 64, n. 3, p. 475-82, 1978.

MONTAMAT, E. E.; DURAND, S.; BOCCO, J. L.; DE LUCA D'ORO, G. M.; Blanco, A. Identification of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by kinetoplast DNA probes. **J Euk Microbiol**, v. 46, p. 155-159, 1999.

MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol**, v. 19, p. 683–765, 2001.

MUELLER, T. D.; ZHANG, J. L.; SEBALD, W.; DUSCHL, A. Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1592, p. 237–250, 2002.

NEAL, R. A.; VAN BUEREN, J. Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* “*in vivo*” and “*in vitro*”. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 82, p. 709-71, 1988.

NELMS, K.; KEEGAN, A. D.; ZAMORANO, J.; RYAN, J. J.; PAUL, W. E. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. **Annu. Rev. Immunol**, v. 17, p. 701–738, 1999.

NÓBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; OBARA, M. T.; COSTA, E. Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit, **Brazil. Emerg Infect Dis**, v. 15, p. 653–655, 2009.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. T_H1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nature Rev. Immunol**, v. 7, p. 425–428, 2007.

PIRES J. G.; PEREIRA, F. E. *Trypanosoma cruzi* (CL strain) in mice changes the chronotropic effect of isoproterenol *in vitro*. **Braz J Med Biol Res**, v. 20, n. 3-4, p. 445-7, 1987.

RODRIGUES, A. A.; SAOSA, J. S. S.; SILVA, G. K.; MARTINS, F. A.; SILVA, A. A.; NETO, C. P. S. S.; HORTA, C. V.; ZAMBONI, D. S.; SILVA, J. S.; FERRO, E. A. V.; SILVA, C. V. IFN- γ Plays a Unique Role in Protection against Low Virulent *Trypanosoma cruzi* Strain. **PLOS Neglected Tropical diseases**, v. 6, issue 4, 2012.

ROVAL, L. E.; AOKI, A.; GEREZ de BURGOS, N. M.; BLANCO, A. Effect of Gossypol on trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **J. Protozool**, v. 37, p. 280-286, 1990.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature reviews Immunology**, v. 10, n 171, 2010.

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

SOUTO, R. P.; ZINGALES, B.. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. **Mol Biochem Parasitol**, v. 62, p. 45-52. 1993.

TEIXEIRA, M. M. G.; YOSHIDA, N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. **Mol. Biochem. Parasitol**, v. 18, p. 271–282, 1986.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **J. Exp. Med.** v. 204, p. 239–243, 2007.

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Moléstia de Carlos Chagas." **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 276- 294, 1911.

WHO-<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>, accessed at january 2015.

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

YOSHIDA, N.; BLANCO, S. A.; ARAGUTH, M. F.; RUSSO, M.; GONZÁLEZ, J. The stagespecific 90-Kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 39, p. 39–46, 1990.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. S. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1051-4, 2009.

FIGURE LEGENDS

Supplemental figure 1: Standard curve of qPCR using the SYBR Green system

A-Standard amplification curve generated by 6 fold serial dilutions of DNA from culture trypomastigotes from G and CL strain (from 10^{10} to 10^5 parasites/mL) and negative controls. Slope: $-3,2 \approx 105\%$ of efficiency. B-Linear regression curve and regression coefficient, $R^2=0,99$. C-Dissociation/melting curve analysis of samples amplicons. $T_m \approx 76^\circ\text{C}$.

Figure 1: Parasites DNA quantification by qPCR

Graphs indicating DNA quantification of G strain (white bars) and CL strain (black bars) during acute (3 hours, 5 days, 15 days) and chronic phase (3 months and 6 months) of infection in stomach (A), heart (B) and spleen (C). Control group was not infected (striped bar). All the experiments were made using 5 animals per group. One way-ANOVA was used to assess statistical significance (** $p < 0,001$).

Figure 2: Histopathological analysis by inflammatory score of HE stained organs

Indication of inflammatory score ranging from 0 to 4 (4- frequent and very intense; 3- frequent and intense; 2-occasional and attenuated; 1- rare and weak; 0- absent) of HE stained organs from animals infected with *T. cruzi* metacyclic tripomastigotes from G (white bars) or CL strain (black bars). Control group was not infected (striped bar). A- Inflammatory score in stomach. At side there are representative images (magnified 10x) from control (at left) and infected animals (at right), in this case at 6 months post-infection by CL strain. The arrows indicate edema and morphological changes. B- Inflammatory score in heart. At side there are representative images (magnified 10x) from control (at left) and infected animals (at right), in this case at 6 months post-infection by G strain. There are, also, images with magnified 40x to better view the inflammatory focus. The arrows indicate inflammatory recruited. C- Inflammatory score in spleen. At side there are representative images (magnified 10x) from control (at left) and infected animals (at right), in this case at 6 months post-infection by CL strain. Arrows indicate edema at this site. All the experiments were made using 5 animals per group. One way-ANOVA was used to assess statistical significance (** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$).

Figure 3: Cytokines detection in stomach

IL-12p40 (A), IFN- γ (B), TNF- α (C), IL-1 α (D), IL-5 (E), IL-6 (F), IL-4 (G), IL-10 (H), IL-9 (I), MIP-1 β (J), LIX (K) and Eotaxin (L) kinetics expression in stomach of mice orally infected with *T. cruzi* metacyclic tripomastigotes from G (white bars) or CL (black bars) strains. Control group was not infected (striped bar). All the experiments were made using 5 animals per group. One way-ANOVA was used to assess statistical significance (*** p<0,001; ** p< 0,005).

Figure 4: Cytokine detection in stomach (cont.)

KC (A), RANTES (B), MIP-1 α (C), MIG (D), IP-10 (E), GM-CSF (F), G-CSF (G), M-CSF (H), IL-3 (I), IL-2 (J), IL-7 (K), VEGF (L) kinetics expression in stomach of mice orally infected with *T. cruzi* metacyclic tripomastigotes from G (white bars) or CL (black bars) strains. Control group was not infected (striped bar). All the experiments were made using 5 animals per group. One way-ANOVA was used to assess statistical significance (*** p<0,001).

Figure 5: Cytokine detection in heart

IL-12p40 (A), IFN- γ (B), TNF- α (C), IL-1 α (D), IL-5 (E), IL-6 (F), IL-4 (G), IL-10 (H), IL-9 (I), MIP-1 β (J), LIX (K) and Eotaxin (L) kinetics expression in heart of mice orally infected with *T. cruzi* metacyclic tripomastigotes from G (white bars) or CL (black bars) strains. Control group was not infected (striped bar). All the experiments were made using 5 animals per group. One way-ANOVA was used to assess statistical significance (*** p<0,001; *p<0.05).

Figure 6: Cytokines detection in heart (cont.)

KC (A), RANTES (B), MIP-1 α (C), MIG (D), IP-10 (E), GM-CSF (F), G-CSF (G), M-CSF (H), IL-3 (I), IL-2 (J), IL-7 (K), VEGF (L) kinetics expression in heart of mice orally infected with *T. cruzi* metacyclic tripomastigotes from G (white bars) or CL (black bars) strains. Control group was not infected (striped bar). All the experiments were made using 5 animals per group. One way-ANOVA was used to assess statistical significance (*** p<0,001,*p<0.05).

Figure 7: Cytokines detection in spleen

IL-12p40 (A), IFN- γ (B), TNF- α (C), IL-1 α (D), IL-5 (E), IL-6 (F), IL-4 (G), IL-10 (H), IL-9 (I), MIP-1 β (J), LIX (K) and Eotaxin (L) kinetics expression in spleen of mice orally infected with *T. cruzi* metacyclic tripomastigotes from G (white bars) or CL (black bars) strains. Control group was not infected (striped bar). All the experiments were made using 5 animals per group. One way-ANOVA was used to assess statistical significance (***) p<0,001).

Figure 8: Cytokines detection in spleen (cont.)

KC (A), RANTES (B), MIP-1 α (C), MIG (D), IP-10 (E), GM-CSF (F), G-CSF (G), M-CSF (H), IL-3 (I), IL-2 (J), IL-7 (K), VEGF (L) kinetics expression in spleen of mice orally infected with *T. cruzi* metacyclic tripomastigotes from G (white bars) or CL (black bars) strains. Control group was not infected (striped bar). All the experiments were made using 5 animals per group. One way-ANOVA was used to assess statistical significance (***) p<0,001).

Supplemental figure 1: Standard curve of qPCR using the SYBR Green system

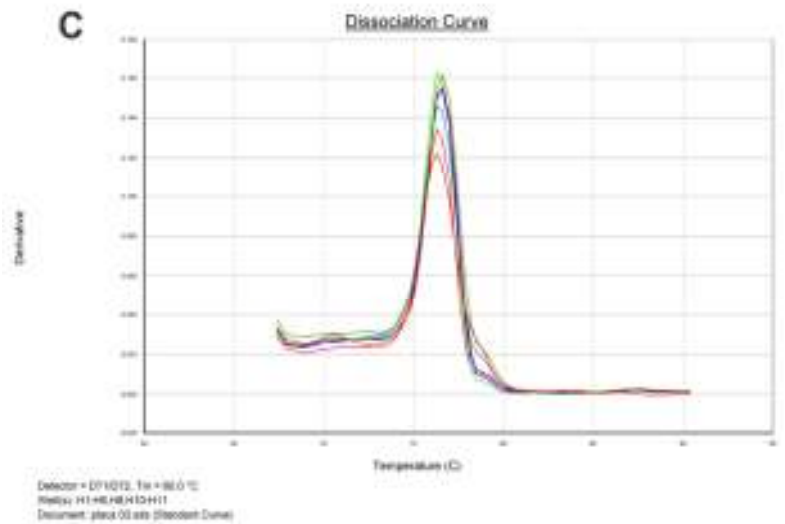
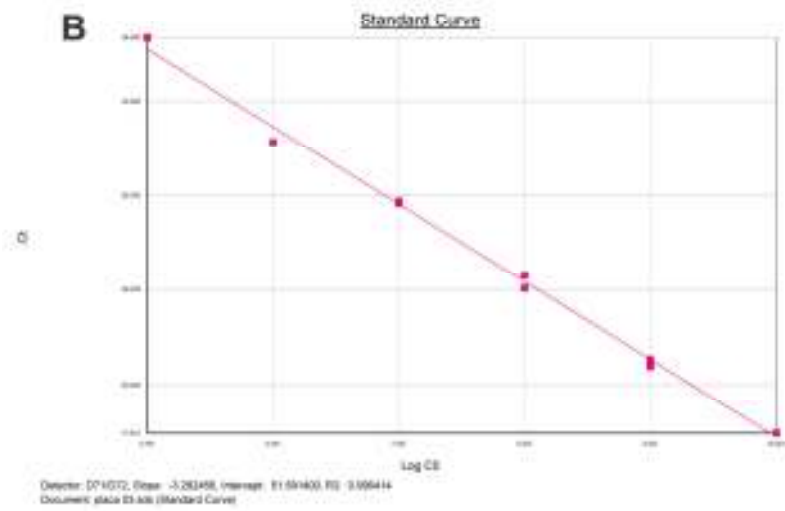
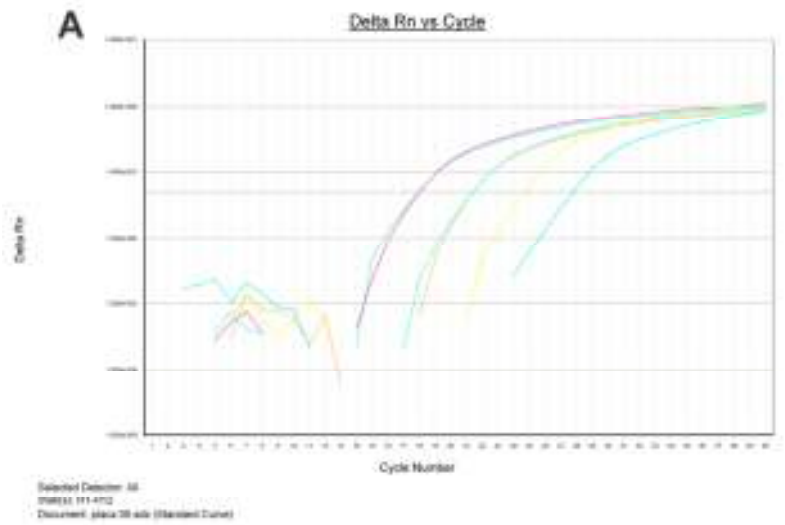


Figure 1: Parasite DNA quantification by qPCR

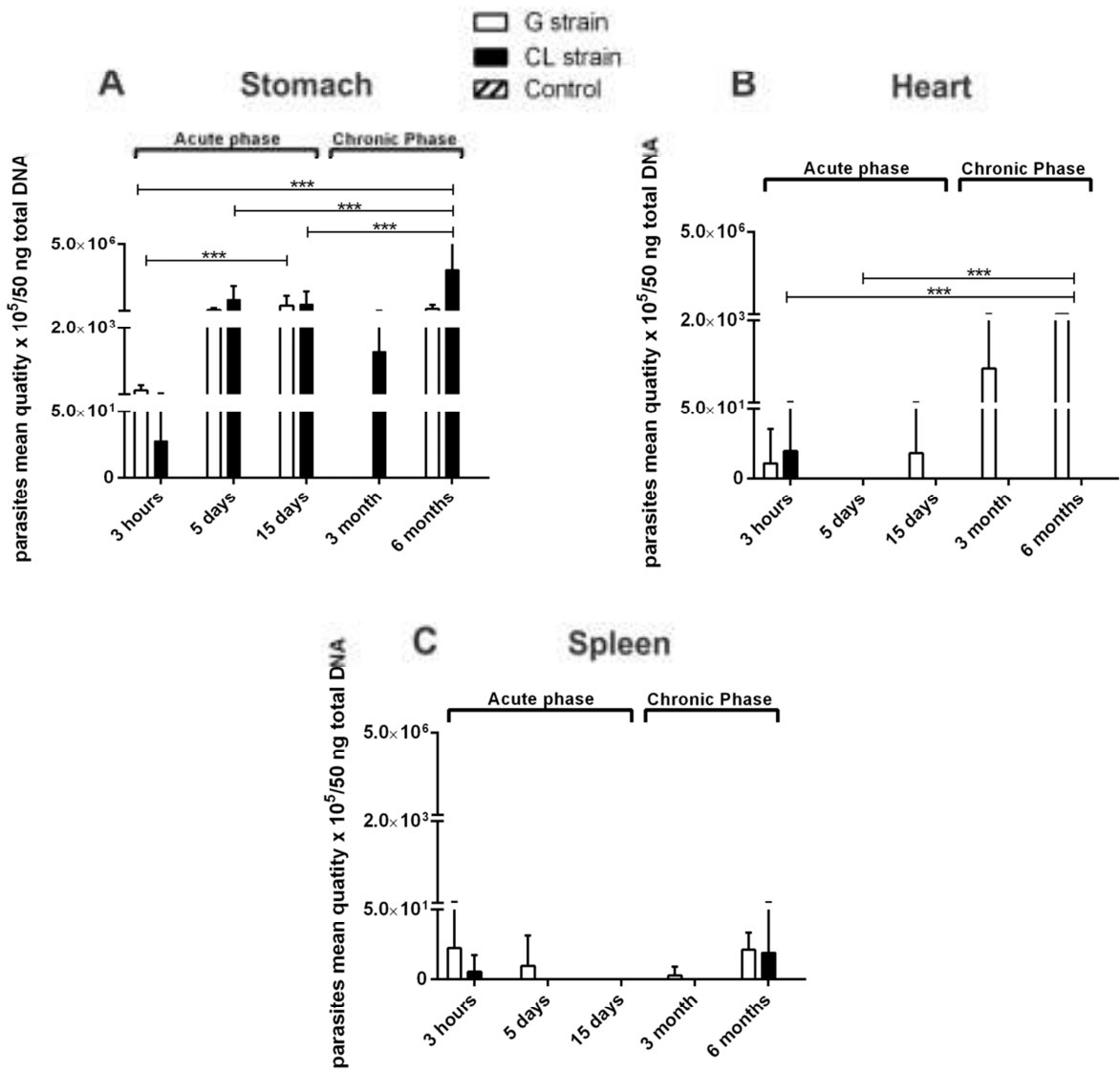


Figure 2: Histopathological analysis by inflammatory score of HE stained organs

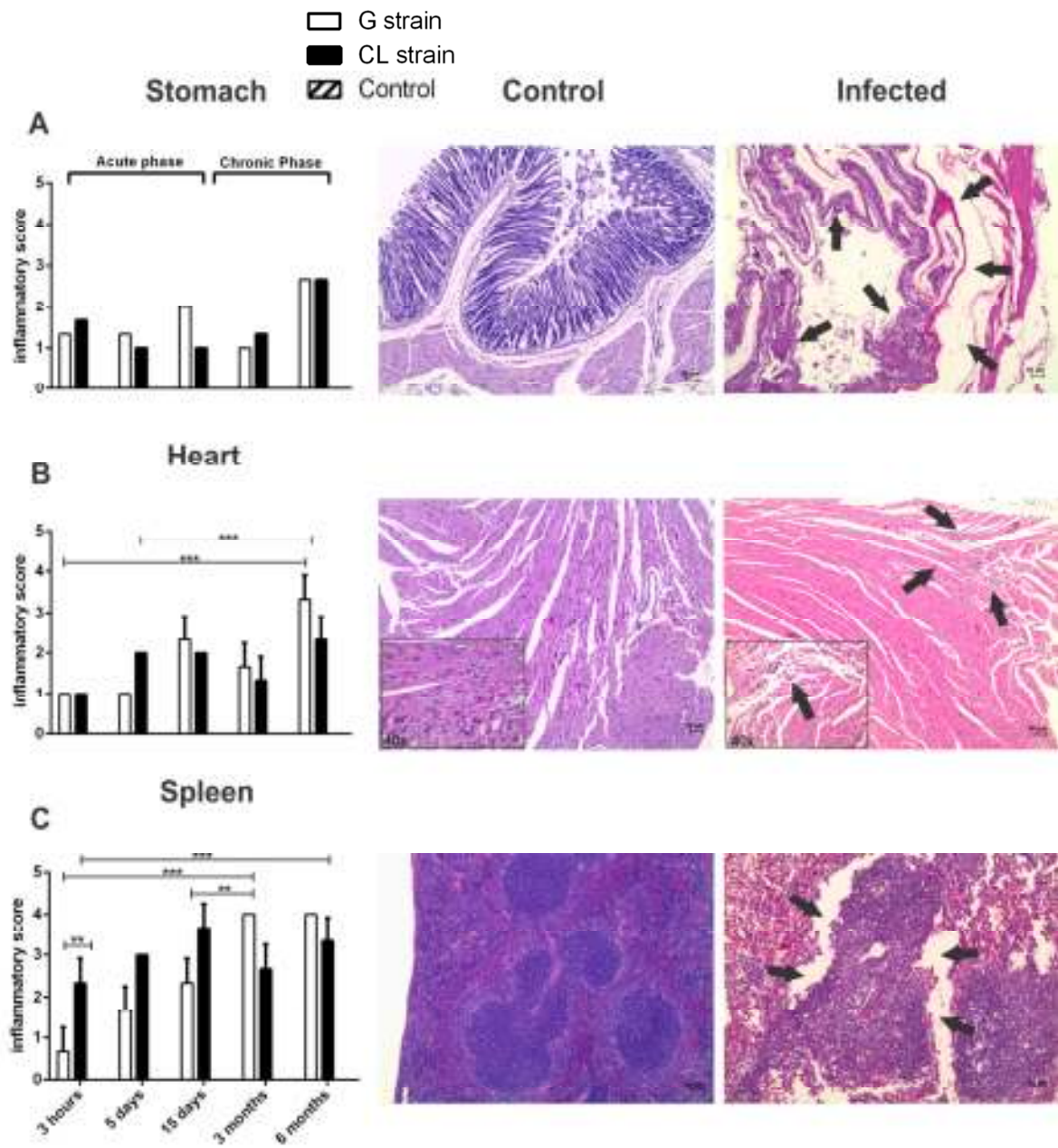


Figure 3: Cytokines detection in stomach

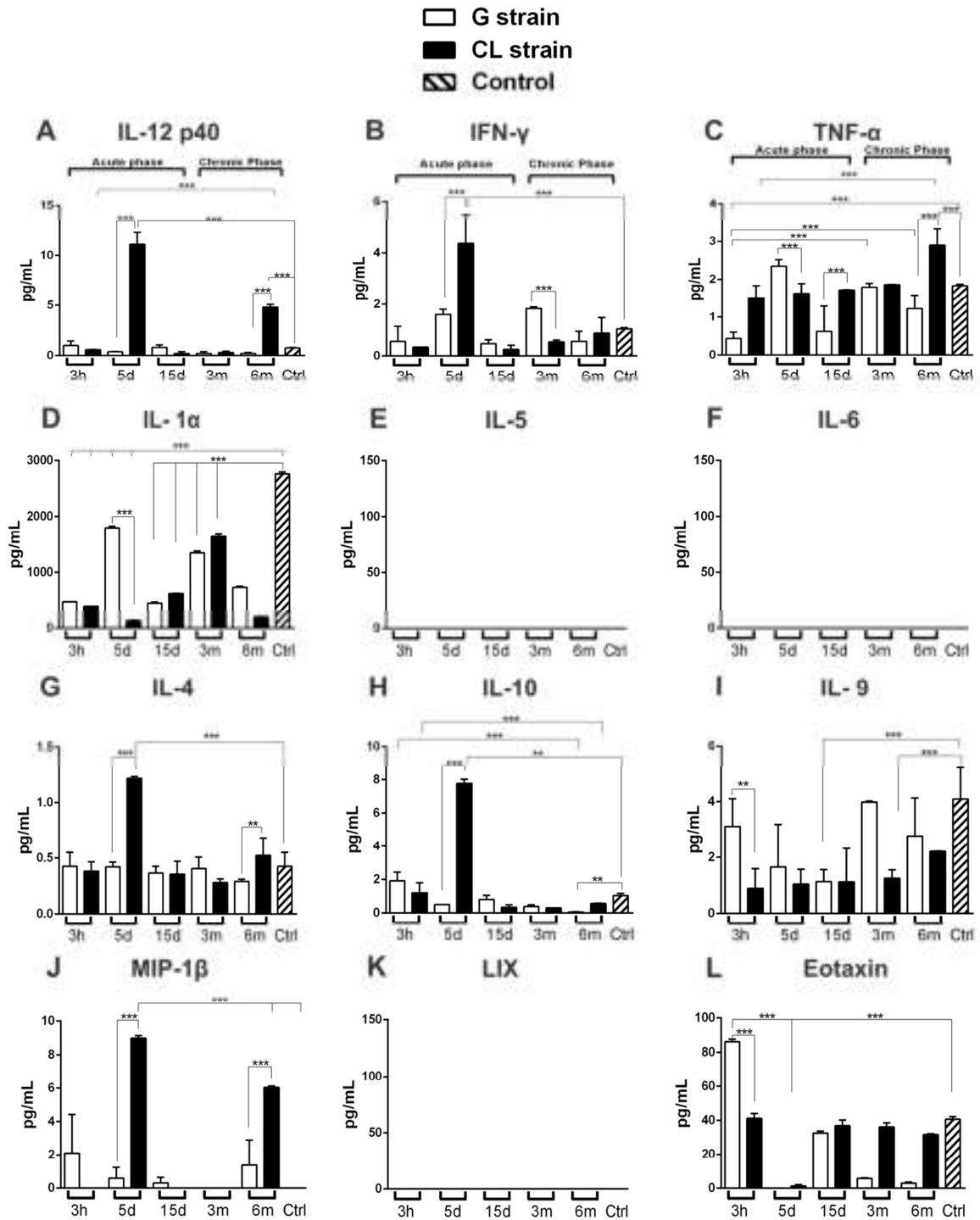


Figure 4: Cytokines detection in stomach (cont.)

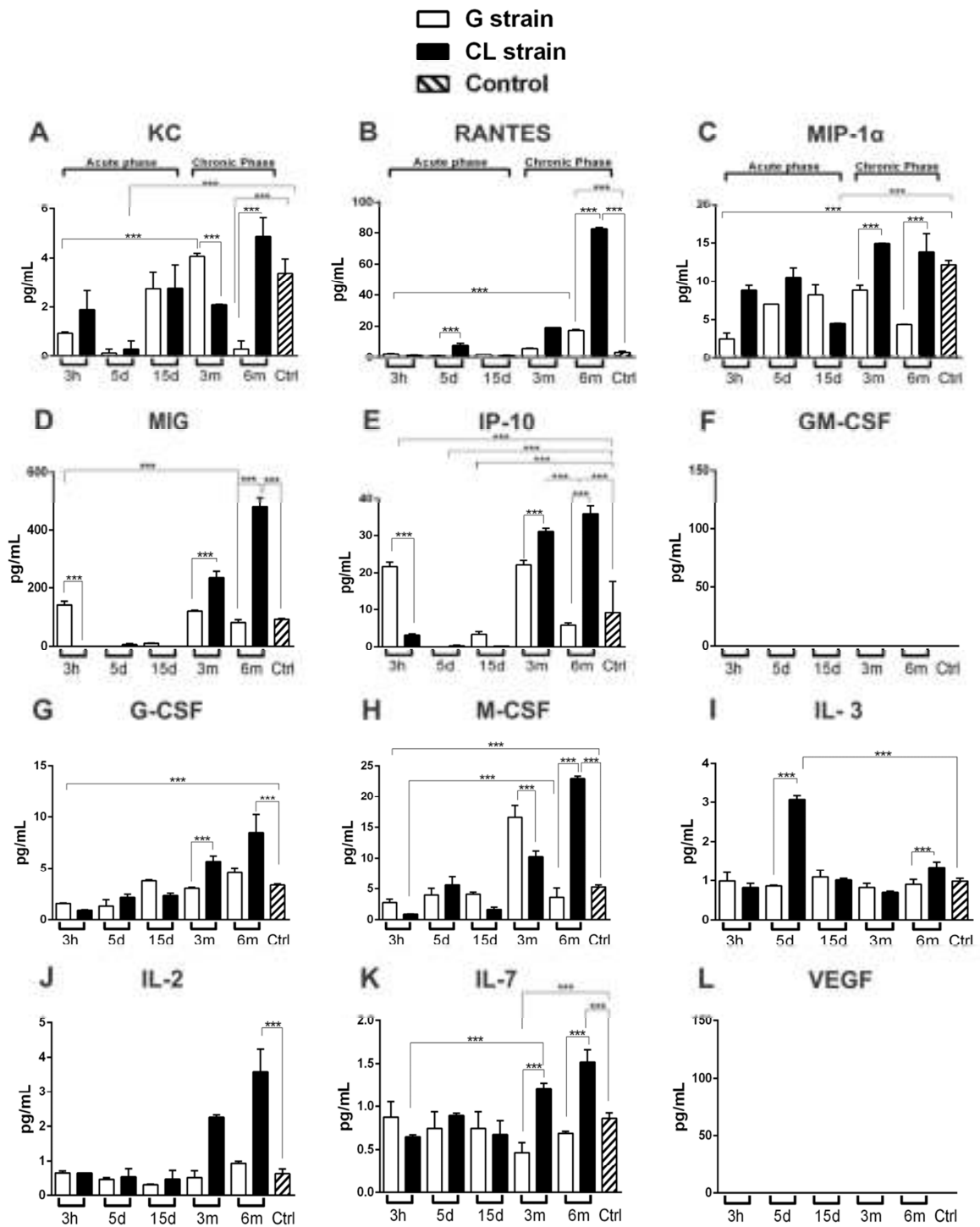


Figure 5: Cytokines detection in heart

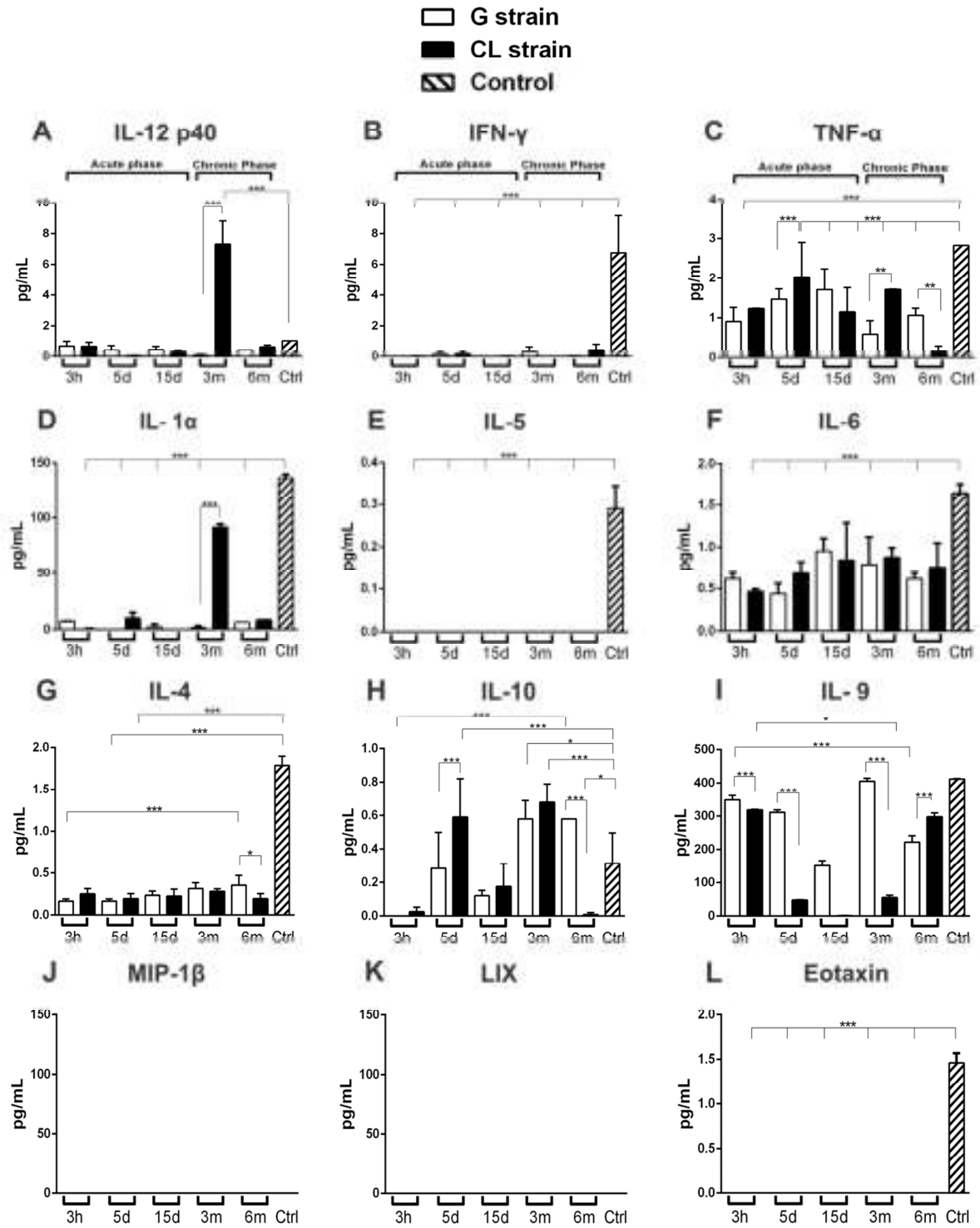


Figure 6: Cytokines detection in heart (cont.)

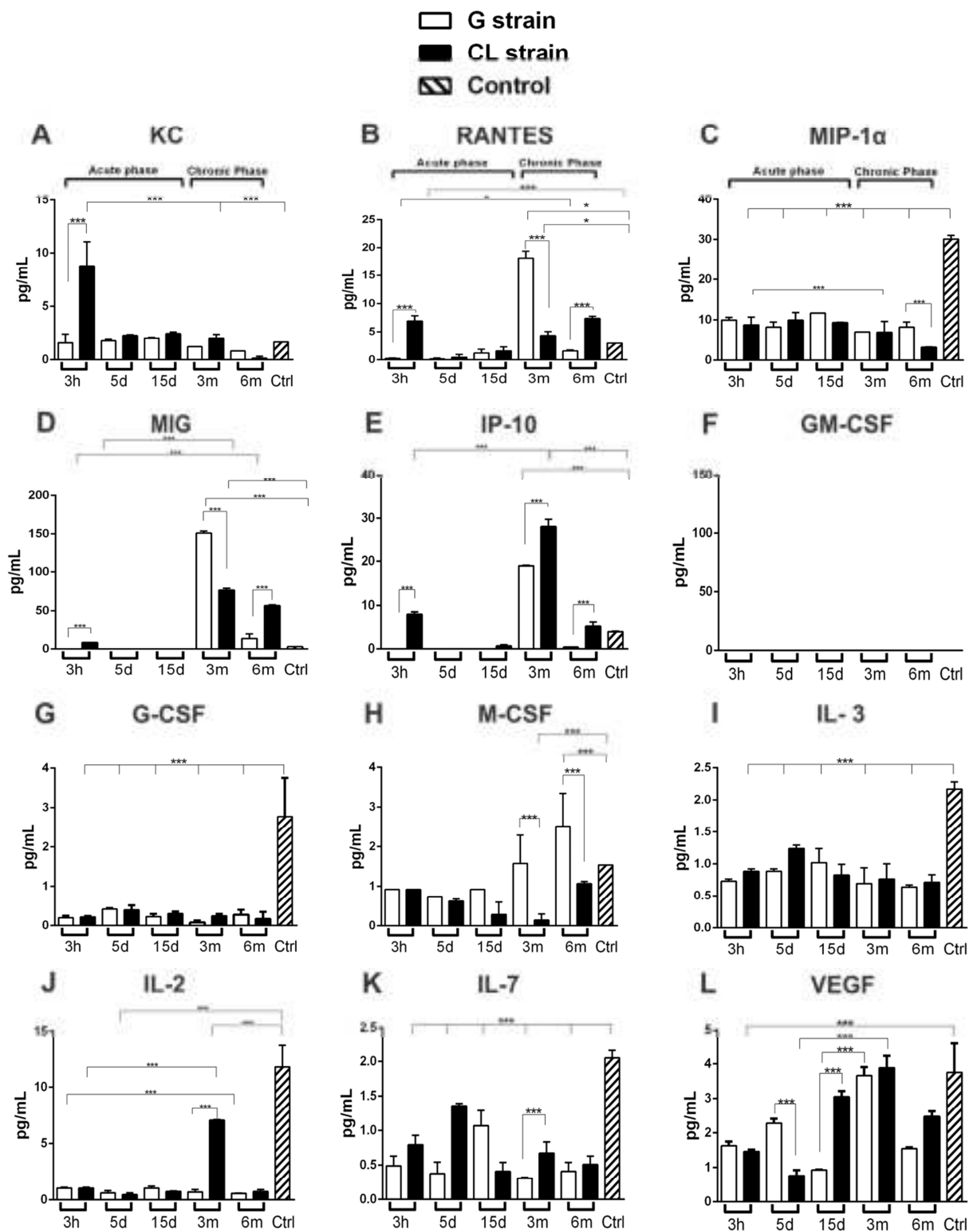


Figure 7: Cytokines detection in spleen

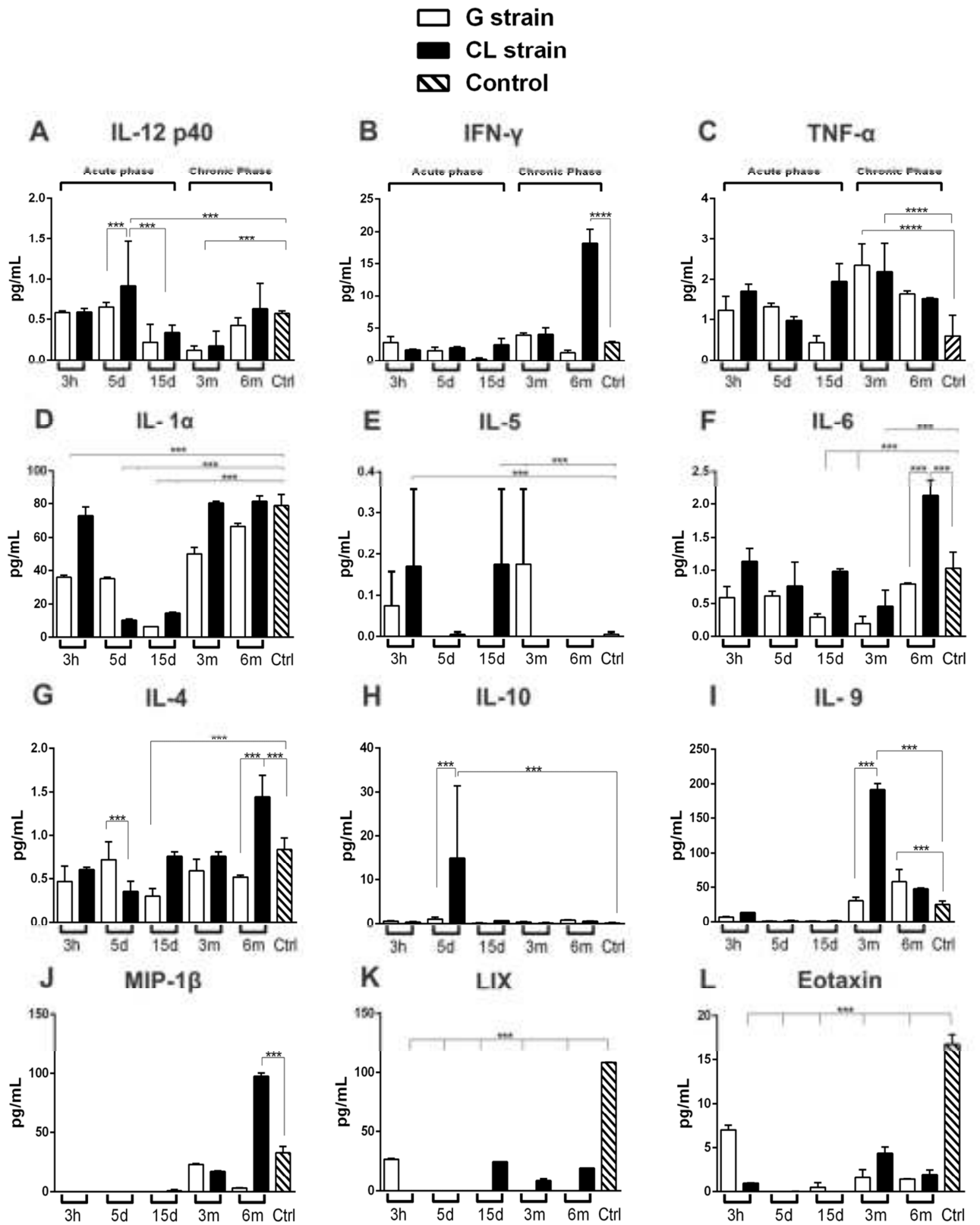
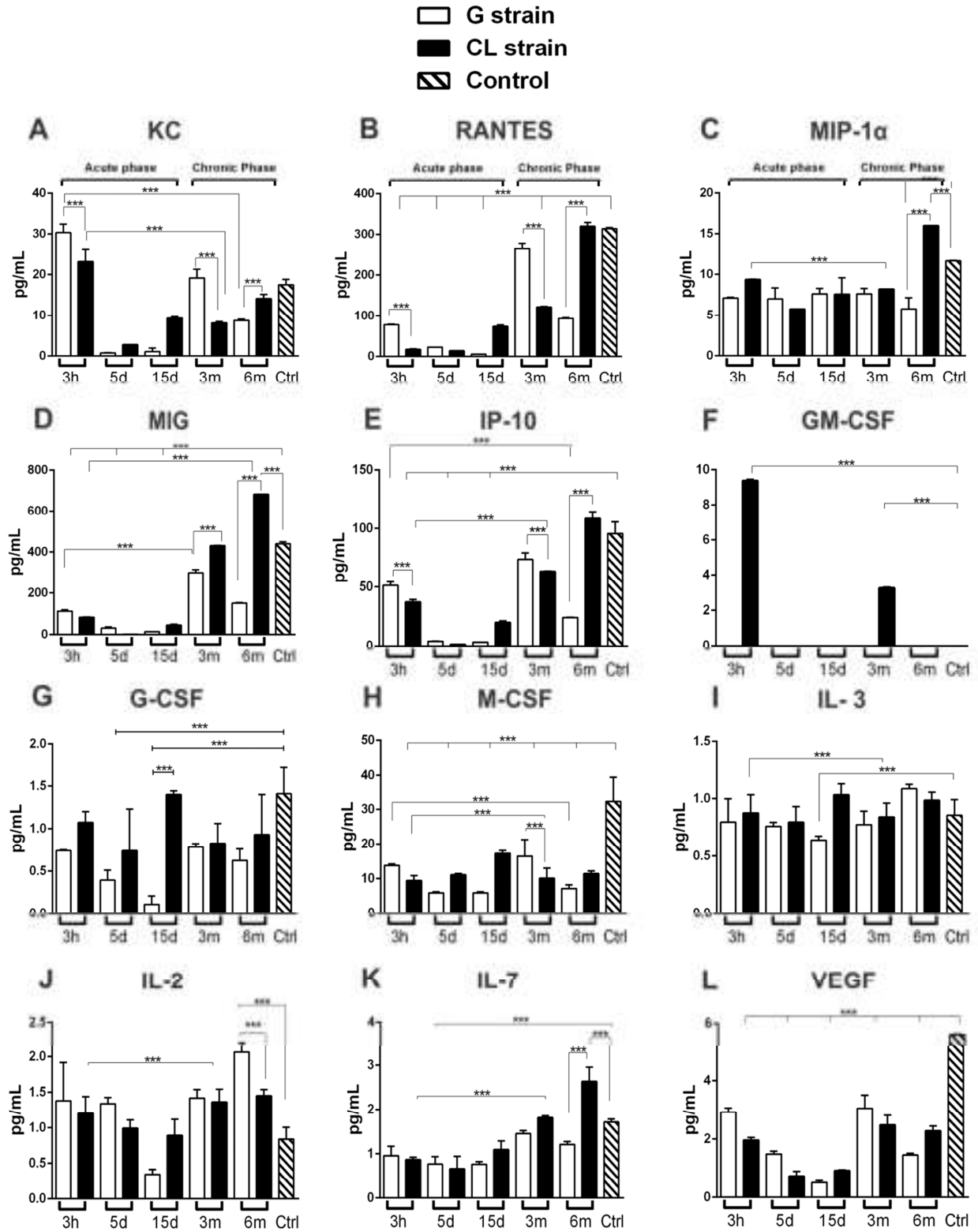


Figure 8: Cytokines detection in spleen (cont.)



6.0- ARTIGO 3- A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* P21 enhances phagocytosis

A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis

Adele A. Rodrigues¹*, Tatiana M. Clemente¹*, Marlus A. dos Santos¹*, Fabrício C. Machado¹*, Rafael G. B. Gomes¹*, Heline Hellen T. Moreira³, Mário C. Cruz², Paula C. Brígido¹, Paulo C. F. dos Santos¹, Flávia A. Martins¹, Diana Bahia², Juliana T. Maricato², Luiz M. R. Janini², Eduardo H. Reboredo³, Renato A. Mortara², Claudio V. da Silva¹*

1 Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brazil, **2** Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brazil

Abstract

Background: P21 is a secreted protein expressed in all developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. The aim of this study was to determine the effect of the recombinant protein based on P21 (P21-His₆) on inflammatory macrophages during phagocytosis.

Findings: Our results showed that P21-His₆ acts as a phagocytosis inducer by binding to CXCR4 chemokine receptor and activating actin polymerization in a way dependent on the PI3-kinase signaling pathway.

Conclusions: Thus, our results shed light on the notion that native P21 is a component related to *T. cruzi* evasion from the immune response and that CXCR4 may be involved in phagocytosis. P21-His₆ represents an important experimental control tool to study phagocytosis signaling pathways of different intracellular parasites and particles.

Citation: Rodrigues AA, Clemente TM, dos Santos MA, Machado FC, Gomes RGB, et al. (2012) A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis. PLoS ONE 7(12): e51384. doi:10.1371/journal.pone.0051384

Editor: Joy Sturtevant, Louisiana State University, United States of America

Received: April 12, 2012; **Accepted:** November 6, 2012; **Published:** December 10, 2012

Copyright: © 2012 Rodrigues et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Process number: APQ-00621-11), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Process number: 23038005295/2011-40) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: silva_cv@yahoo.com.br

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Phagocytosis is the way by which macrophages internalize foreign particles and cellular debris. A diverse repertoire of receptors expressed by macrophages allows them to respond to a variety of external stimuli. Immune receptors come in a variety of classes, such as the well-characterized phagocytic Fc γ receptor (Fc γ R) and the complement receptor (CR). Much of our understanding of phagocytic signaling comes from studies on Fc γ R-mediated phagocytosis, which is a spatially and temporally coordinated series of events initiated by the binding of an opsonized IgG particle with Fc γ R that leads to actin polymerization and the formation of pseudopods that extend around the particle to form a phagocytic cup. The pseudopods then completely surround the particle forming a phagosome, which is then internalized and its contents degraded (for review: [1]).

To promote phagocytosis, macrophages must be recruited, where chemokines play a crucial role during this process. Nonetheless, the signaling pathways for the various chemokines, leading to efficient chemotaxis of macrophages, are not yet well characterized [1]. Chemokines act through the G protein coupled receptor (GPCR) superfamily, such as CCR5 and CXCR4. Ligand binding to GPCRs induces conformational changes of the

receptor that are transmitted to the cytoplasmic domains of the protein, enabling the protein to couple with an intracellular heterotrimeric G protein. The intracellular G protein acts as an intracellular signal by activating or inhibiting cytoplasmic enzymes. CCR5 was first isolated as a functional GPCR that is antagonized by various CC chemokines. CXCR4 was originally identified as an orphan receptor called leukocyte-derived seven transmembrane domain receptor (LESTR), but did not receive much attention until its isolation as a coreceptor for HIV-1 and the discovery of its natural ligand, SDF-1/CXCL12. In their function as HIV coreceptors, CCR5 and CXCR4 physically associate with CD4-activated gp120, which undergoes a conformational change that in turn exposes a hidden coreceptor-binding site. Binding of gp120 to the coreceptor brings the envelope into close proximity to the cell surface and induces gp120 to undergo a second conformational change that allows the gp41 protein to penetrate the cell membrane and form a six-helix array. Through processes that are still unknown, fusion occurs between the cell and viral membranes allowing entry of the viral capsid and proteins (for review: [2]).

F-actin is required for CD4 and CXCR4 redistribution, and it has been shown that activated moesin promotes F-actin redistribu-

bution and CD4-CXCR4 clustering, which are required for efficient X4-tropic HIV-1 infection in permissive lymphocytes [3]. Also, authors have proposed that Arf6 (ADP ribosylation factor 6) GTP/GDP activity has synergy with the key first HIV-1/receptor interactions by maintaining PIP₂-associated membrane dynamics to promote efficient viral fusion and entry in a clathrin-independent manner [4]. Moreover, CXCR4 and CD74 lead to macrophage migration inhibitory factor (MIF) endocytosis [5], and RpkA, a highly conserved GPCR of *Dictyostelium discoideum*, plays a role in phagocytosis and anti-bacterial defense [6]. Thus, these data suggest that GPCR may play important role during phagocytosis in addition to the traditionally well-described functions related to chemotaxis, adhesion, cell survival and proliferation. Moreover, it has been shown that the uptake of *Yersinia pestis* by macrophages lacking CCR5 is significantly decreased [7].

Trypanosoma cruzi can infect and replicate in macrophages. During invasion, *T. cruzi* interacts with different macrophage receptors to induce its own phagocytosis. However, the nature of those receptors and the molecular mechanisms involved are poorly understood. The phagocytosis of tissue culture-derived trypomastigotes (TCT) is mediated by macrophage Pronase-sensitive membrane components. Also, there is indirect evidence that Fc γ R and CR participate in *T. cruzi* phagocytosis but are not essential [8]. Moreover, *T. cruzi* amastigote forms interact with both the macrophage mannose receptor and mannose-binding proteins in a way that facilitates the adhesion of amastigotes to macrophages [9]. Recently, authors have shown that phagocytosis induced by *T. cruzi* infection involves Toll-like receptor (TLR) 2 but are independent of TLR4 receptors [10]. In addition, a previous report suggested that once the surface components of *T. cruzi* trypomastigotes are recognized by macrophage receptors, they trigger the activation of a tyrosine phosphorylation cascade, PI3-kinase recruitment, and assembly of actin filaments at the site of initial cell-to-cell contact, resembling the events described during phagocytosis [11].

We have recently characterized a novel *T. cruzi* protein whose role during parasite cell invasion is not completely understood. First, we searched *T. cruzi* genomic database for species-specific hypothetical proteins that showed a high probability of being secreted or membrane-anchored and thus likely to be involved in host-cell invasion. A sequence that codes for a 21-kDa protein with a high probability of being secreted was selected. After cloning this protein sequence, we found that it was a ubiquitous secreted protein of *T. cruzi*. The recombinant form (P21-His₆) adhered to HeLa cells in a dose-dependent manner. Also, HeLa cell treatment with P21-His₆ augmented invasion by *T. cruzi* metacyclic trypomastigotes and extracellular amastigotes [12]. Since P21 promoted *T. cruzi* cell invasion, we examined its potential to enhance the phagocytosis of zymosan particles and protozoan parasites by mouse inflammatory macrophages. Our results suggested that P21-His₆ binds to CXCR4 expressed in macrophages and acts as a phagocytosis inducer by activating actin polymerization in a way dependent on the PI3-kinase signaling pathway. This is the first study that shows a possible role of CXCR4 in mediating phagocytosis and that P21-His₆ may represent an important experimental tool to elucidate the signaling pathway for the phagocytosis of particles and intracellular parasites.

Results

P21-His₆ Upregulates Zymosan Phagocytosis

To determine if P21-His₆ would upregulate phagocytosis, we incubated C57BL/6 peritoneal macrophages with different concentrations of P21-His₆ and zymosan particles. We also tested 40 μ g/ml of the recombinant protein at different time points. P21-His₆ increased phagocytosis in a dose- and time- independent manner. Incubation with BSA showed no impact on macrophage phagocytosis activity (Figure 1A, B). Since P21-His₆ was purified from *Escherichia coli*, we needed to ascertain that the observed phenotype was due to the recombinant protein activity *per se* and not to residual bacterial LPS. Thus, we performed the zymosan phagocytosis assay in the presence of polymyxin B, using macrophages derived from *toll-4*^{-/-} mice. The results showed that the pro-phagocytic activity observed was in fact due to the effect of P21-His₆ on the macrophages (Figure 1C). Also, we performed similar uptake experiments using denatured P21-His₆, which showed a significantly lower zymosan uptake (Figure 1D). In addition, previous incubation of the recombinant protein with anti-P21-His₆ polyclonal antibody decreased phagocytosis to basal levels in FcR-blocked macrophages (Figure 1E). On the other hand, macrophages without FcR blocking also showed high phagocytosis rates. Pre-immune serum sample at the same dilutions as anti-P21-His₆ did not affect P21-His₆ activity (data not shown).

P21-His₆ Induces Macrophage Actin Polymerization

Phagocytosis is a process dependent on actin polymerization. Hence, peritoneal macrophages were incubated with 40 μ g/ml of P21-His₆ for 30 minutes and 1 and 2 hours and afterwards stained with TRITC-phalloidin. Cell samples were then analyzed by flow cytometry to determine the status of actin polymerization by measuring fluorescence intensity. Actin polymerization was increased as assessed by the intensity of phalloidin labeling of treated cells when compared to untreated control macrophages (Figure 2 A, B). Also, anti-P21-His₆ polyclonal antibody abolished actin polymerization only in FcR-blocked macrophages (Figure 2 A, B). After 3 hours of treatment, the recombinant protein lost its activity (Figure 2 C). A pre-immune serum sample at the same dilutions as anti-P21-His₆ did not affect P21-His₆ activity (data not shown).

P21-His₆ Regulates Phagocytosis and Actin Polymerization by Activating the PI3-kinase Signaling Pathway

Phagocytosis assays in the presence or absence of P21-His₆ as well as different signaling pathway inhibitors showed that the pro-phagocytic activity of P21-His₆ depended on the PI3-kinase signaling pathway (Figure 3 A). The recombinant protein did not show pro-phagocytic activity in macrophages treated with PI3-kinase inhibitor. Although a small statistically significant difference was observed for macrophages treated with m-Tor and ERK 2 inhibitors, the recombinant protein still showed high pro-phagocytic activity almost reaching its performance rates compared to untreated control macrophages. Thus, the statistical significance of the effects observed for the m-Tor and ERK2 signaling pathways did not seem to be correlated to a major biological impact on pro-phagocytic property of P21-His₆ (Figure 3 D, G). Moreover, in macrophages treated with AKT, n-Ras, MEK 1 or MEK1/2, P21-His₆ induced phagocytosis to a similar extent as the untreated control cells (Figure 3 B, C, E, F).

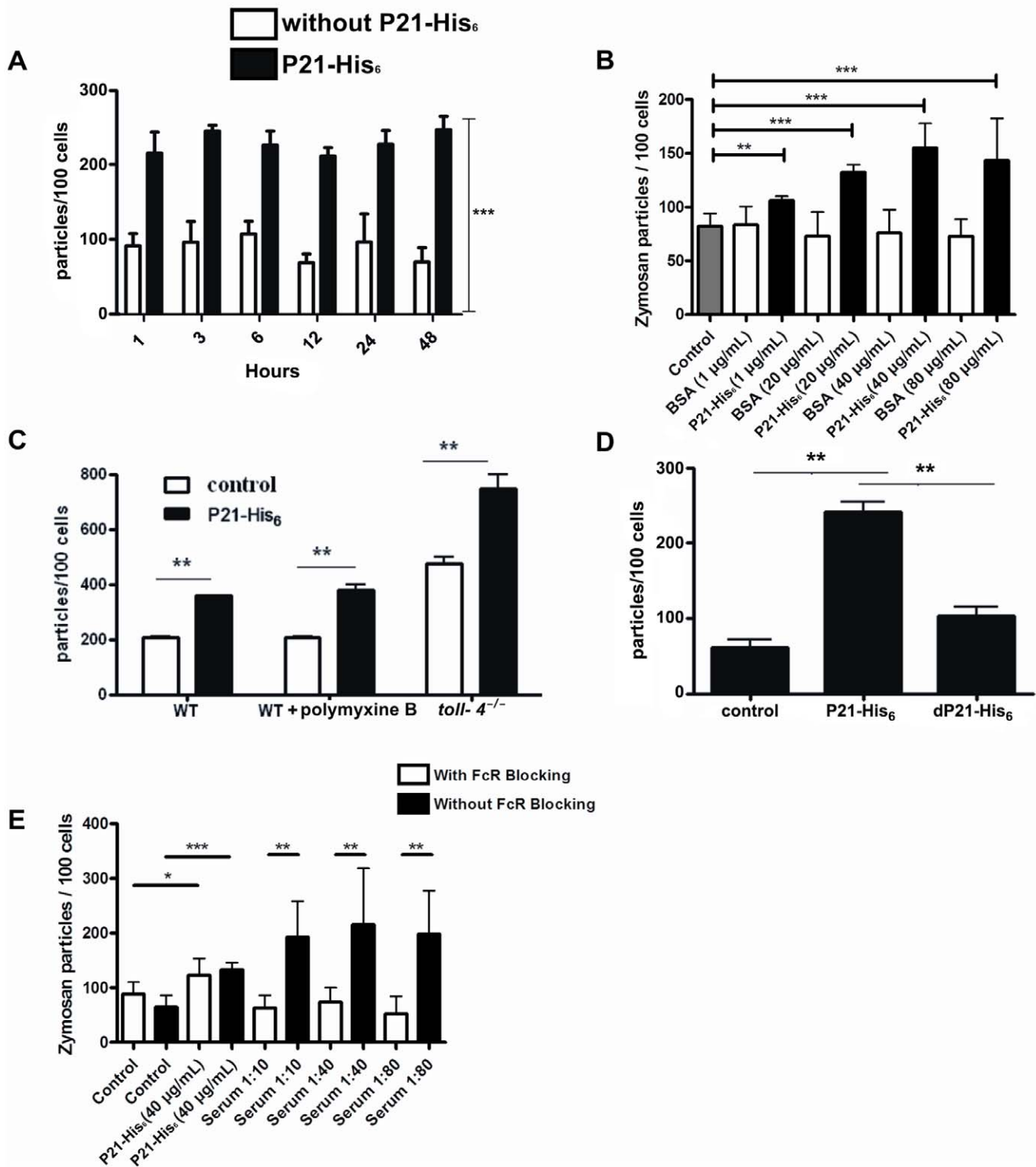


Figure 1. P21-His₆ enhances phagocytosis of zymosan particles. Phagocytosis assay using zymosan particles treated or not with P21-His₆. (A) peritoneal macrophages, treated in different periods, 1, 3, 6, 12, 24 and 48 hours. P21-His₆ enhanced zymosan internalization, in all treatment periods. (B) Peritoneal macrophages (grey bar), treated with BSA (white bars) or P21-His₆ (black bars) at different concentrations: 1, 20, 40 and 80 µg/ml. P21-His₆, but not BSA, enhanced zymosan internalization at all concentrations tested. (C) Peritoneal macrophages obtained from wild-type (WT) or *toll4*^{-/-} animals, treated or not with P21-His₆, and those also treated with polymyxin B. P21-His₆ treatment increased zymosan phagocytosis in both, the WT and *toll4*^{-/-} macrophages. Also, treatment with polymyxin B did not inhibit P21-His₆ activity. (D) Phagocytosis assay using folded and denatured P21-His₆ (dP21-His₆) at 100°C. Note that only folded protein was able to upregulate phagocytosis. (E) Peritoneal macrophages with (white bars) or without (black bars) FcR blocked were incubated with P21-His₆ (40 µg/ml) previously opsonized in different concentrations of serum. Peritoneal macrophages with FcR did not show an enhanced zymosan internalization as those without FcR blocked. *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0051384.g001

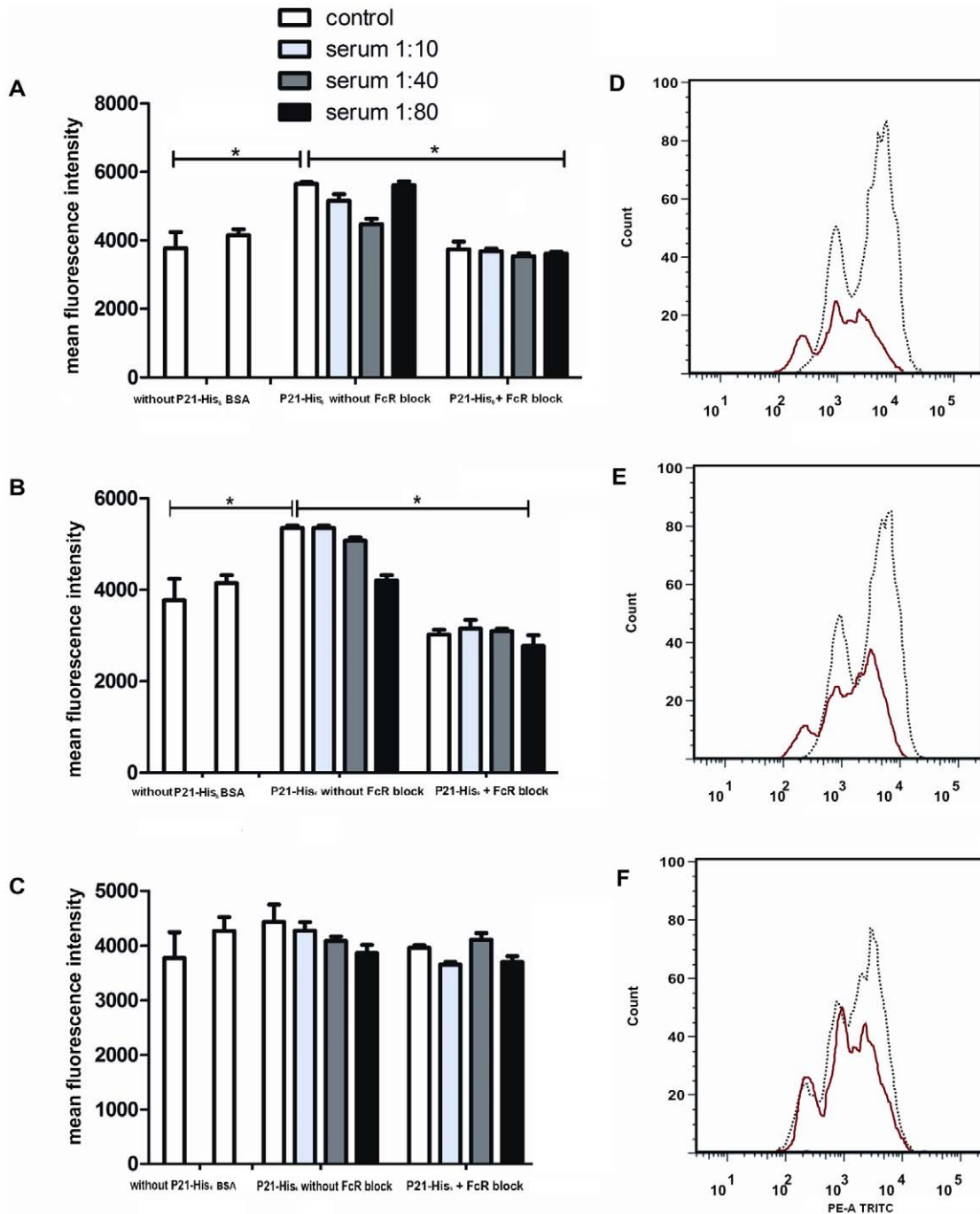


Figure 2. Peritoneal macrophages treated with P21-His₆ show increased actin polymerization. Peritoneal macrophages were treated or not with P21-His₆ for 0.5, 1.0 and 3.0 hours in the presence or not of anti-P21-His₆ polyclonal antibody and FcR blocking. The actin cytoskeleton was stained with TRITC-phalloidin. Flow cytometry showed that the cells treated with the recombinant protein had a higher fluorescence intensity than the control cells following 0.5 (A) and 1.0 hour (B) of incubation. After 3.0 hours of incubation, the protein lost its activity (C). Representative histograms are also shown. Macrophages not treated with P21-His₆ (D); macrophages treated with P21-His₆ (E); macrophages with FcR-blocking and treated with P21-His₆ previously incubated with anti-P21-His₆ polyclonal antibody (F). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0051384.g002

P21-His₆ Binds to CXCR4 Chemokine Receptor

We hypothesized that a GPCR would be the mammalian cell receptor for the protein. To gain insight into this aspect, we performed the zymosan phagocytosis assay using macrophages treated or not with AMD3100 (CXCR4 inhibitor) and macrophages from *ccr4*^{-/-} mice in the presence or absence of P21-His₆.

Host cell treatment with CXCR4 inhibitor completely abolished P21-His₆ pro-phagocytic activity (Figure 4 A, B) indicating CXCR4 could be the macrophage receptor for P21-His₆. We also performed Western blotting of peritoneal macrophages treated or not with P21-His₆ to determine the amount of CXCR4 expression. Band densitometry showed that CXCR4 expression

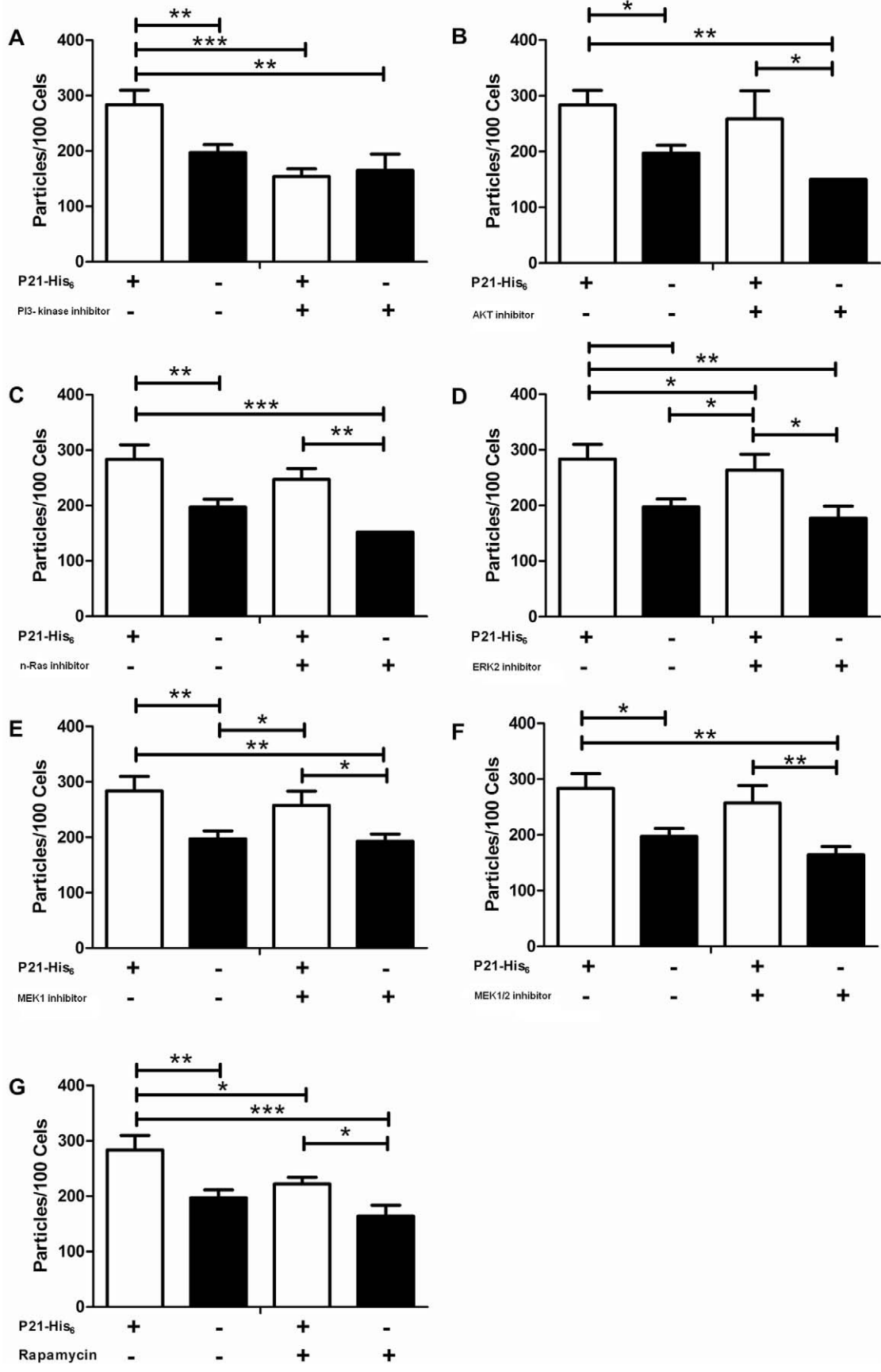


Figure 3. P21-His₆ activity depends on PI3-kinase pathway. Peritoneal macrophages were incubated with zymosan, treated or not with P21-His₆, and also treated or not with inhibitors to PI3-kinase (A), AKT (B), n-Ras (C), ERK 2 (D), MEK 1 (E), MEK1/2 (F), m-Tor (G). P21-His₆ activity was not detected in the presence of PI3-K inhibitor. *P<0.5, **P<0.01, ***P<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0051384.g003

was increased in macrophages treated with P21-His₆ (Figure 4 C). Taken together, these results strengthened the idea that the receptor for the recombinant protein in macrophages is CXCR4.

P21-His₆ Increases Phagocytosis of Different Intracellular Parasites

Finally, we turned our attention to the possible effect of the recombinant protein on *Leishmania amazonensis* and *Toxoplasma gondii* uptake by macrophages. Here, we used *T. cruzi* extracellular amastigotes as the positive control [12]. The results obtained confirmed our hypothesis that P21-His₆ upregulates phagocytosis by macrophages. In macrophages treated with P21-His₆, there was a threefold increase in the phagocytosis of *T. cruzi* extracellular amastigotes and also a fourfold and fivefold increase in the uptake of *L. amazonensis* promastigotes and *T. gondii* tachyzoites, respectively (Figure 5).

Discussion

Endocytosis is essential for virtually all eukaryotic cells to internalize nutrients, antigens, pathogens, and cell surface receptors from the plasma membrane into membrane-bounded, endocytic vesicles to regulate cell homeostasis, cell signaling, and development. Distinct mechanisms mediate endocytic uptake of a

large variety of different-sized cargoes ranging from small molecules to viruses or bacteria [13]. In this context, macrophages are strategically located throughout body tissues, where they ingest and process foreign materials, dead cells and debris and recruit additional macrophages in response to inflammatory signals [14]. Moreover, authors have identified a small GTPase effector protein, IQGAP1, as a novel diacylglycerol kinase (DGK ζ)-associated complex protein, and DGK ζ has been found to be involved in IQGAP1/Rac1-mediated bacterial phagocytosis upon LPS stimulation in macrophages [15].

Here we evaluated the potential of a recombinant protein based on *T. cruzi* P21 in upregulating phagocytosis, its putative macrophage receptor and the signaling pathway triggered upon P21-His₆ interaction with the host cell. Our results showed that P21-His₆ is able to upregulate phagocytosis in a way dependent on binding to CXCR4 actin polymerization and the signaling pathway triggered by PI3-kinase.

P21-His₆ pro-phagocytic activity depended neither on time of incubation nor protein concentration. Also, polyclonal antibody anti-P21-His₆, denaturated protein, polymyxin treatment and the use of peritoneal macrophages derived from *toll4*^{-/-} mice confirmed that the pro-phagocytic activity observed in different assays was due to the recombinant protein and not to residual LPS from the bacterial extract. Experiments performed without FcR

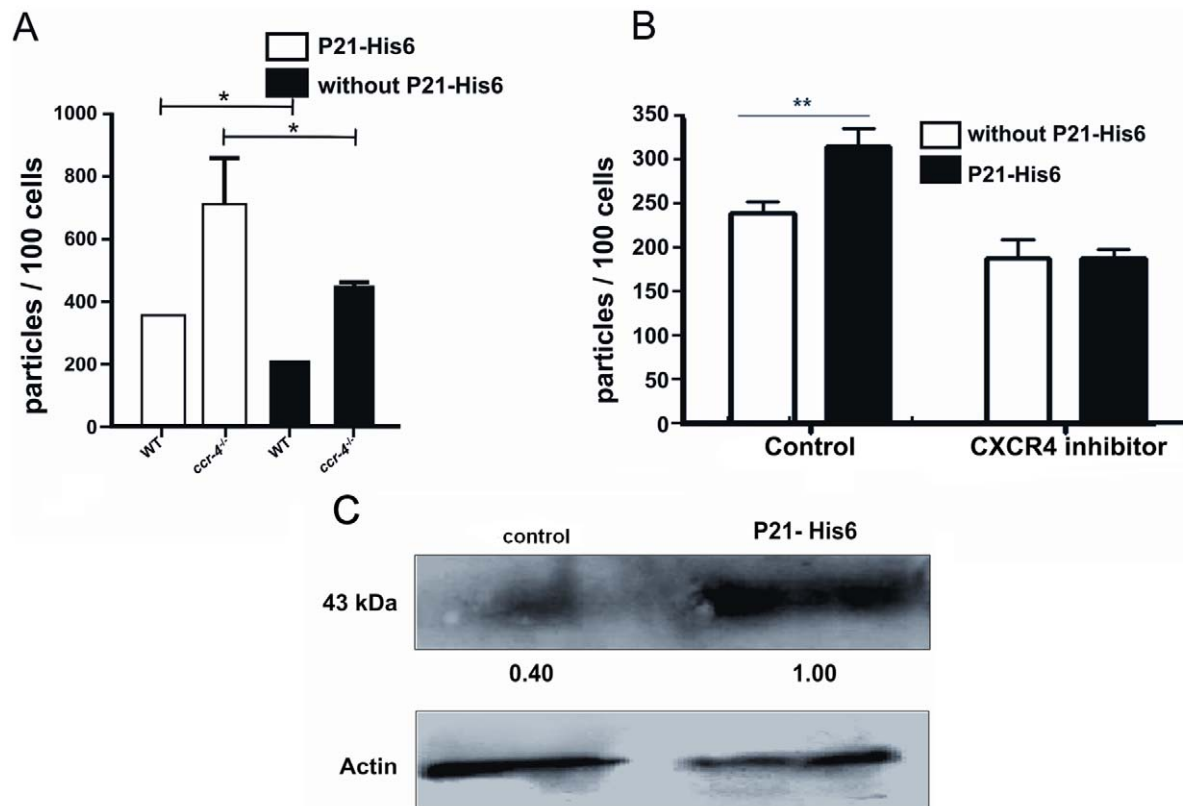


Figure 4. P21-His₆ binds to CXCR4 chemokine receptor. CCR4 knockout did not affect P21-His₆ pro-phagocytic activity (A). CXCR4 inhibitor abolished the pro-phagocytic P21-His₆ activity (B). Peritoneal macrophages treated with P21-His₆ showed an increased expression of CXCR4 revealed by Western blotting (C). *P<0.5, **P<0.01, ***P<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0051384.g004

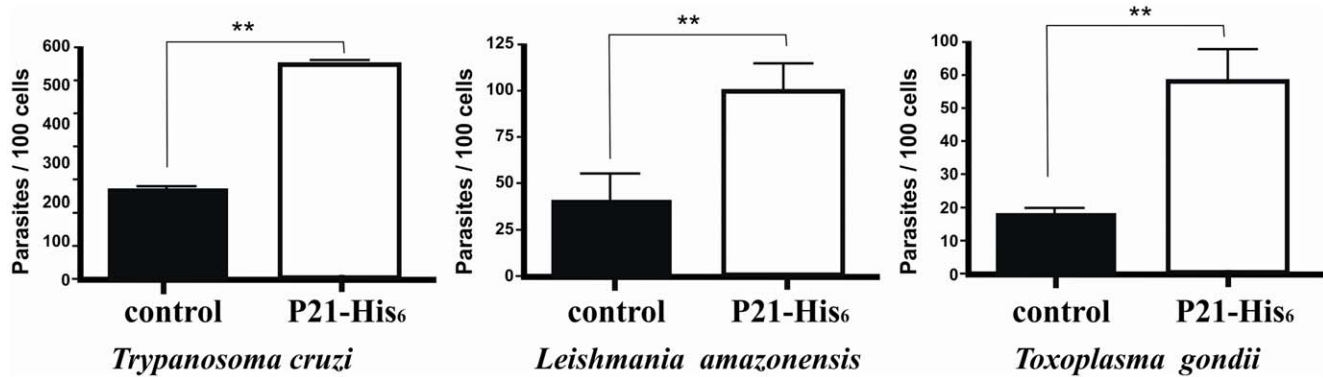


Figure 5. P21-His₆ augments phagocytosis of different intracellular parasites. Peritoneal macrophages were incubated with *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis* or *Toxoplasma gondii* and treated or not with P21-His₆. The number of internalized parasites in treated cells was higher than in control cells, indicating that P21-His₆ increases parasite internalization. *P<0.5, **P<0.01, ***P<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0051384.g005

blocking showed an increased phagocytosis probably due to the cross-linking of FcR by the immune complex.

Actin assembly during phagocytosis creates protrusions that encompass extracellular materials. Actin also supports the processes of invagination of a membrane segment into the cytoplasm, elongation of the invagination, scission of the new vesicle from the plasma membrane, and movement of the vesicle away from the membrane [16]. Accordingly, macrophage actin polymerization triggered by P21-His₆ was demonstrated by flow cytometry. The results supported our findings, since P21-His₆ triggered actin polymerization at the time points studied and since this activity was completely abolished following treatment with anti-P21-His₆ and FcR blocking of macrophages.

Turning our attention to the putative signaling pathway triggered upon P21-His₆ interaction with peritoneal macrophages, our results using inhibitors of different signaling pathways showed that P21-His₆ relies on the PI3-kinase signaling pathway in a way independent of AKT. This intriguing result is supported by other studies [17,18]. Studies have demonstrated that PI3K-dependent signal transduction of Rho-family GTPase activities occurs during FcR-mediated phagocytosis and that PI3K-dependent deactivation of Cdc42 is necessary for phagocytosis. Moreover, the activities of PI3K and Cdc42 are linked: FcR-activated Cdc42 stimulates PI3K, which increases concentrations of PI(3,4,5)P₃ in phagocytic cups, allowing the PI(3,4,5)P₃-dependent deactivation of Cdc42 that is necessary for completion of phagocytosis [19]. In addition, a study has provided important evidence on PI3-kinase activation during *T. cruzi* cell invasion [20]. Also, we observed a small statistical difference during zymosan phagocytosis by macrophages that were previously treated with m-Tor and ERK2 inhibitors in the presence of P21-His₆. Besides, the recombinant protein showed high pro-phagocytic activity. Thus, these results indicated that these signaling pathways may not be too relevant for the biological process triggered by P21-His₆. We have a study underway to better understand P21-His₆ signaling process, using besides inhibitors, other approaches such as Western blotting of phosphorylated proteins, PCR array and phosflow kits.

Considering the variety of cell surface receptors, we hypothesized that GPCRs could be the host cell receptor for P21-His₆ according to recently published studies [6,7]. We performed experiments using peritoneal macrophages from *ccr4*^{-/-} mice and using CXCR4 inhibitor. Our results from experiments using CXCR4 inhibitor showed that CXCR4 could be the P21-His₆ receptor in macrophages. As a GPCR, the mechanism of CXCR4

receptor activation is mediated by coupling to an intracellular heterotrimeric G-protein associated with the inner surface of the plasma membrane [21,22]. CXCR4 signaling during chemotaxis, adhesion, cell survival and proliferation has been shown to involve PI3-kinase, AKT, MAPK, the Ras-activated signaling pathway and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) [22–25]. On the other hand, the signaling pathway triggered during CXCR4-dependent phagocytosis is largely unknown, since this is the first report to consider CXCR4 as a phagocytosis mediating receptor. This issue will be further investigated in novel studies from our group.

Recombinant DNA technology has allowed scientists to prepare large amounts of proteins based on their native ones to study the putative activity of the native protein. This study revealed that P21 may be an important *T. cruzi* host immune response evasion factor. P21 pro-phagocytic activity may allow the parasite its intracellular permanence, where it can disrupt the phagolysosome compartment and grow freely in the host cell cytoplasm. Moreover, a well-known activity of a recombinant protein may turn out to be an alternative control tool for biologists to study processes possibly activated by another protein. For instance, the recombinant form of metacyclic trypomastigotes gp82 induces apoptotic cell death in melanoma cells [26]. We thus believe that P21 represents a novel tool for scientists to study phagocytosis.

All together, our results showed that P21-His₆ upregulates phagocytosis and actin cytoskeleton remodeling by binding to CXCR4 receptor and signaling via PI3-kinase. Also, the recombinant protein activity sheds light on the possible role of the *T. cruzi* native P21 in regulating parasite escape from host immune response by giving the circulating parasites the chance to invade the host cell and multiply in the cytoplasm.

Methods

Reagents

PI3-kinase inhibitor, LY294002 (Cell Signaling), concentration: 50 μM, time of treatment: one hour prior to phagocytosis.

Ras – farnesyl thiosalicylic acid inhibitor (Cayman Chemical Company: 10010501), concentration: 50 μM, time of treatment: one hour prior to phagocytosis.

Akt inhibitor (Calbiochem: 124005), concentration: 25 μM, time of treatment: one hour prior to phagocytosis.

MEK 1/2 U0126 inhibitor (Cell Signaling: 9903), concentration: 10 μM, time of treatment: two hours prior to phagocytosis.

MEK 1 inhibitor PD98059 (Cell Signaling: 9900S), concentration: 50 μ M, time of treatment: one hour prior to phagocytosis.

5-Iodotubercidin (ITU) (Santa Cruz Biotechnology: sc3531), concentration: 20 μ M, time of treatment: one hour prior to phagocytosis.

Rapamycin (FRAP/mTOR inhibitor) and ERK2 inhibitor – (Cell Signaling), concentration: 10 nM, time of treatment: one hour prior to phagocytosis.

CXCR4 inhibitor - AMD 3100 octahydrochloride (MERCK), concentration: 30 μ M, time of treatment: 30 minutes prior to phagocytosis.

TRITC-phalloidin (Sigma-Aldrich: P5282), dilution: 1:1500.

Polymyxin B (Sigma-Aldrich: 81271) (25 μ g/ml). Time of treatment: 30 minutes prior to phagocytosis.

Bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) was used as a control for P21-His₆ at the same concentrations and time of incubation.

Ethics

Maintenance and care of animals complied with the guidelines of the Laboratory Animal Ethics Committee from the Universidade Federal de Uberlândia. Animal euthanasia was performed in accordance with international welfare grounds, according to the American Veterinary Medical Association Guidelines on Euthanasia. This study was approved by the ethics committee of animal research from Universidade Federal de Uberlândia (process: CEUA/UFU 105/10).

Animals

Male wild-type C57BL/6, *ccr4*^{-/-} C3H/HePas and *toll-4*^{-/-} mice were provided and maintained at the animal facilities of the Department of Biochemistry and Immunology, School of Medicine of Ribeirão Preto, USP (Ribeirão Preto, Brazil). Male mice were six to eight weeks old and were kept under standard conditions on a 12-h light-dark cycle in a temperature-controlled room (25 \pm 2°C) with food and water *ad libitum*.

Parasite Culture

Promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) were cultivated in Schneider's Insect Medium (LGC Biotecnologia), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cultilab, Campinas, Brazil), 100 μ g/mL gentamicin and 2 mM L-glutamine (Gibco BRL-Life Technologies, New York, USA), at 26°C. Parasites in stationary phase were used for the experimental infection in macrophages. The parasites were maintained infective by periodic hamster footpad inoculations. Extracellular amastigotes from the *T. cruzi* G strain were obtained after differentiation of TCT in LIT medium, pH 5.8, overnight as previously described (Silva et al., 2006). Tachyzoites of the RH strain of *Toxoplasma gondii* were harvested from the peritoneal cavities of out-bred Swiss Webster mice that had been injected with 10⁷ organisms 2 days earlier.

P21-His₆ Purification

P21-His₆ (GenBank: EU004210.1) was purified as previously described [12]. The quality of purification was demonstrated by SDS-PAGE.

Peritoneal Macrophage Culture and Invasion Assays

Peritoneal macrophages from 6- to 8-week-old male C57BL/6 mice were harvested with 3 mL of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) from the peritoneal cavity of stimulated mice (1–3 mL of 3% thioglycollate medium; Gibco, Gaithersburg, MD; 3 days before) (mouse inflammatory macrophage). The cells were

centrifuged and adjusted to 1 \times 10⁶/mL in DMEM supplemented with 12.5 mM HEPES, 2 g/L sodium bicarbonate, 2 mM L-glutamine, 50 μ g/mL gentamicin and 10% FBS (complete medium). The cells were seeded in 24-well flat-bottomed plates (Corning Corporation; Cambridge, MA, USA) at a density of 2 \times 10⁵/200 μ L/well and then incubated overnight in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C to allow the cells to adhere. Afterwards, 10 zymosan particles or 10 amastigotes of *T. cruzi* G strain or 20 promastigotes of *L. amazonensis* or 5 tachyzoites of *T. gondii* RH strain were added for each macrophage plated on a round coverslip in the presence or not of 40 μ g/ml P21-His₆. The parasites and zymosan particles were left in contact with macrophages for 2 hours and then washed with PBS, fixed in Bouin's solution and Giemsa stained. In inhibitor-treated cells, treatment was performed according to the manufacturers' directions prior to the addition of zymosan particles. For the experiments with anti-P21-His₆ polyclonal antibody, the recombinant protein was incubated or not with different dilutions of the polyclonal antibody for 30 minutes in DMEM and then used during zymosan phagocytosis assays using peritoneal macrophages with or without FcR blocking. For FcR blocking, serum samples from healthy C57BL/6 mice were diluted in DMEM (1:20) and incubated with seeded macrophages for 30 minutes and then washed 3 times with PBS. Also, pre-immune serum samples were used as control for anti-P21-His₆ antibody. Results were expressed as the number of internalized parasites or particles/100 cells.

F-actin Staining

Inflammatory macrophages were recruited *in vivo* by intraperitoneal thioglycollate inoculation. After three days, cells were harvested from the mouse peritoneal cavity, washed 3 times with PBS, counted and adjusted to 1 \times 10⁶ cells/mL in PBS. Macrophages with FcR blocking were pre-treated for 30 minutes with serum (1:20 dilution) obtained from healthy C57BL/6 mice. The cells (FcR blocked or not) were then incubated with P21-His₆, opsonized (anti-P21-His₆) or not for different time periods: 30 minutes and one and three hours. The opsonized protein was obtained by incubating with serum of immunized C57BL/6 mice diluted 1:10, 1:40 and 1:80, for 30 minutes. The cells were fixed with 4% formaldehyde, washed 3 times and then left in PBS. F-actin staining was performed using TRITC-phalloidin diluted 1:1000 in PBS+saponin (0.01%). After washing, samples were analyzed by FACSCantoII (BD) and the results were obtained using FlowJo software (version 7.6.3).

Western Blotting

To determine if the treatment of macrophages with P21-His₆ would upregulate CXCR4 expression, 10⁷ peritoneal macrophages were seeded in a 6-well plate and treated or not with P21-His₆ for one hour. Following three PBS washes, macrophages were removed with a cell scraper and lysed in electrophoresis buffer (Santa Cruz Biotechnology). After SDS-PAGE and electrophoretic protein transfer, the membrane was incubated with anti-CXCR4 (Santa Cruz Biotechnology) followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma-Aldrich). The CXCR4 band was detected by chemiluminescence, and densitometry was performed using ImageJ software. Similar amounts of spotted extracts were checked with anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich).

Statistical Analysis

The significance of differences was determined by one-way ANOVA performed according to the VassarStats program (Richard Lowry 1998–2006), available at <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html> or using the GraphPad Prism

program, version 5.01 for Student-t analysis. The differences were considered significant when $p < 0.05$. All experiments were performed 4 to 8 times in triplicate.

Acknowledgments

We would like to thank Biomed Proofreading for English correction.

References

- Park H, Ishihara D, Cox D (2011) Regulation of tyrosine phosphorylation in macrophage phagocytosis and chemotaxis. *Arch Biochem Biophys* 510: 101–111.
- Alkhatib G (2009) The biology of CCR5 and CXCR4. *Curr Opin HIV AIDS* 4: 96–103.
- Barrero-Villar M, Cabrero JR, Gordón-Alonso M, Barroso-González J, Álvarez-Losada S, et al (2008) Moesin is required for HIV-1 induced CD4-CXCR4 interaction, F-actin redistribution, membrane fusion and viral infection in lymphocytes. *J Cell Science* 122: 103–113.
- García-Expósito L, Barroso-González J, Puigdomènech I, Machado JD, Blanco J, et al (2011) HIV-1 requires Arf6-mediated membrane dynamics to efficiently enter and infect T lymphocytes. *Mol Biol Cell* 22: 1148–1166.
- Schwartz V, Kruttgen A, Weis J, Weber C, Ostendorf T, et al (2011) Role for CD74 and CXCR4 in clathrin-dependent endocytosis of the cytokine MIF. *Eur J Cell Biol* doi: 10.1016/j.ejcb.2011.08.006.
- Riyahi T, Frese F, Steinert M, Omosigbo NN, Glockner G, et al (2011) RpkA, a highly conserved GPCR with a lipid kinase domain, has a role in phagocytosis and anti-bacterial defense. *PLoS ONE* 6: e27311.
- Elvin SJ, Williamson ED, Scott JC, Smith JN, Pérez De Lema G, et al (2004) Evolutionary genetics: Ambiguous role of CCR5 in *Y. pestis* infection. *Nature* 30(6998): 417.
- Alcantara A, Brener Z (1980) *Trypanosoma cruzi*: role of macrophage membrane components in the phagocytosis of bloodstream forms. *Exp Parasitol* 50: 1–6.
- Kahn S, Wlekinski M, Aruffo A, Farr A, Coder D, et al (1995) *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. *J Exp Med* 182: 1243–1258.
- Maganto-García E, Punzon C, Terhorst C, Fresno M. (2008) Rab5 Activation by Toll-Like Receptor 2 is Required for *Trypanosoma cruzi* Internalization and Replication in Macrophages. *Traffic*, 9: 1299–1315.
- Vieira M, Dutra JM, Carvalho TM, Cunha-e-Silva NL, Souto-Padrón T, et al (2002) Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Histochem Cell Biol* 118(6): 491–500.
- Silva CV, Kawashita SY, Probst CM, Dallagiovanna B, Cruz M C, et al (2009) Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. *Microbes and Infection* 11: 563–570.
- Krauss M, Haucke V (2012) Shaping membranes for endocytosis. *Rev PhysiolBiochem Pharmacol*. 161: 45–66.
- Murray PJ, Wynn TA (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11: 723–737.
- Okada M, Hozumi Y, Iwazaki K, Misaki K, Yanagida M, et al (2012) DGK ζ is involved in LPS-activated phagocytosis through IQGAP1/Rac1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 420(2): 479–484.
- Mooren OL, Galletta BJ, Cooper JA (2012) Roles for actin assembly in endocytosis. *Annu Rev Biochem*. 81: 661–686.
- Vasudevan KM, Barbie DA, Davies MA, Rabinovsky R, McNear CJ, et al (2009) AKT-independent signaling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer. *Cancer Cell* 16(1): 21–32.
- Lee EJ, Kim N, Kang KH, Kim JW (2011) Phosphorylation/inactivation of PTEN by Akt-independent PI3K signaling in retinal pigment epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 414(2): 384–389.
- Beemiller P, Zhang Y, Mohan S, Levinsohn E, Gaeta I, et al (2010) A Cdc42 Activation Cycle Coordinated by PI 3-Kinase during Fc Receptor-mediated Phagocytosis. *Mol Biol Cell* 21: 470–480.
- Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC, et al (2003) Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J Cell Sci* 116(Pt 17): 3611–3622.
- Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN (2007) G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26: 3122–42.
- Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Manes S, Martínez AC (2001) Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol* 19: 397–421.
- Barbero S, Bonavia R, Bajetto A, et al. (2003) Stromal cell-derived factor 1 α stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer Res* 63: 1969–74.
- Bendall LJ, Baraz R, Juárez J, Shen W, Bradstock KF (2005) Defective p38 mitogen-activated protein kinase signaling impairs chemotactic but not proliferative responses to stromal-derived factor-1 α in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 65: 3290–8.
- Delgado-Martín C, Escibano C, Pablos JL, Riol-Blanco L, Rodríguez-Fernández JL (2011) Chemokine CXCL12 uses CXCR4 and a signaling core formed by bifunctional Akt, extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2, and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) proteins to control chemotaxis and survival simultaneously in mature dendritic cells. *J Biol Chem* 286: 37222–36.
- Atayde VD, Jasiulionis M, Cortez M, Yoshida N (2008) A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 induces apoptotic cell death in melanoma cells. *Melanoma Research*. 18: 172–183.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CVS DB LMRJ JTM RAM EHR. Performed the experiments: AAR TMC RGBG MAdS FCM HHTM MCC JTM PCFdS PCB FAM. Analyzed the data: AAR CVS MAdS FCM. Contributed reagents/materials/analysis tools: CVS DB RAM EHR LMRJ. Wrote the paper: CVS AAR.

7.0 DISCUSSÃO

Nosso trabalho teve duas vertentes principais: a análise do perfil imunológico mediante a infecção por *T. cruzi*, buscando identificar a atuação diferenciada dessa resposta frente a cepas e formas distintas do parasito (tripomastigotas metacíclicos ou amastigotas extracelulares), para promover o controle da infecção e indução da cronificação da doença; a caracterização biofuncional da proteína P21 de *T. cruzi*, buscando analisar sua função para o parasito e atuação na célula hospedeira.

Para tanto, realizamos o primeiro trabalho utilizando formas amastigotas extracelulares da cepa G, previamente conhecidas por possuir maior infectividade *in vitro* em relação à cepa CL, porém com baixa virulência *in vivo*, não apresentando parasitemia perceptível. Buscamos, portanto, compreender o porquê dessa diferença de infectividade em ambientes distintos. Pensamos na possibilidade dessa cepa ser extremamente suscetível à resposta imune do hospedeiro, o que limitaria sua atuação *in vivo*.

T. cruzi é um parasito flagelado extremamente heterogêneo, e suas populações são caracterizadas por uma diversidade morfológica, comportamento biológico heterogêneo, de alta variabilidade genética e distintos cursos clínicos da doença. O modelo clonal-histotrópico da doença de Chagas descreve a correlação entre a estrutura clonal da população de *T. cruzi* e seu tropismo por distintos tecidos, e ainda dá uma explicação plausível para a variedade apresentada por esse parasito (PADILLA, BUSTAMANTE, TARLETON, 2009). Atualmente é aceito que as cepas de *T. cruzi* podem ser divididas em 6 DTUs distintas, *T. cruzi* I a VI (ZINGALES et al, 2009). A cepa G pertence à *T. cruzi* I e apresenta um comportamento particular, sendo que formas tripomastigotas metacíclicas dessa cepa possuem baixa infectividade *in vitro* e ausência de parasitemia *in vivo* (YOSHIDA, 1983). Tal fenótipo é atribuído à expressão de uma glicoproteína GP90, um modulador negativo da invasão celular (YOSHIDA et al, 1990). Distintamente, amastigotas extracelulares da cepa G são altamente infectivos *in vitro*, mas também não induzem parasitemia *in vivo* (SILVA et al, 2006; SILVA et al, 2009). Tais dados fazem com que busquemos compreender o porquê dessa distinção de comportamento em ambientes distintos.

Nesse contexto, compreender como o hospedeiro responde à infecção por amastigotas é de extrema importância, uma vez que amastigotas são as principais formas encontradas durante a fase crônica da doença. Nossa primeira observação foi a

de que a infecção por amastigotas da cepa G não ativam uma via de sinalização dependente de Myd88 e nem de Nod2. Provavelmente outra resposta imune inata relacionada a receptores é ativada durante a infecção por amastigotas. Tal questão poderá ser analisada em estudos adicionais. A infecção em outros animais nocautes mostrou que amastigotas da cepa G foram suscetíveis apenas a produção de IL-12 e IFN- γ (a principal citocina responsável pela secreção de IFN- γ é IL-12). Entretanto observamos um leve pico de parasitemia em camundongos nocautes para IL-12, mais ao início da infecção. Pensamos, então, na possibilidade de IL-18 também estar envolvido na secreção de IFN- γ nesses animais infectados, já que tal citocina possui função similar à de IL-12. Entretanto, animais nocautes para IL-18 não apresentaram parasitemia. Dessa forma, esses resultados mostram o papel redundante dessas citocinas em promover a produção de IFN- γ para o controle da infecção. Camundongos duplamente nocautes para as duas citocinas seriam úteis para sustentar essas hipóteses.

IFN- γ é um importante mediador de resistência à *T. cruzi*. Além de iNOS, IFN- γ regula a expressão de uma grande diversidade de genes, incluindo quimiocinas e receptores de quimiocinas, que mostram ter papel preponderante na proteção contra *T. cruzi* mediada por IFN- γ . No início da infecção, IFN- γ é secretado por células NK e outros tipos celulares, como parte da resposta inata, e mais tardiamente no curso da infecção pela ativação de células T CD4+ e CD8+ (GAZZINELLI et al, 1992; HÖLSHER et al, 1998; ALIBERTI et al, 2001). Recentemente, autores demonstraram pela primeira vez *in vivo*, a importância específica de uma ativação de macrófagos diretamente mediada para o controle da infecção de protozoários (LYKENS et al, 2010). Aqui observamos que IFN- γ tem um papel crucial e único no controle da infecção por amastigotas da cepa G de *T. cruzi*. Óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) são dois tipos de mediadores-chaves envolvidos, não somente na eliminação de patógenos, mas também em injúrias teciduais. Óxido nítrico é produzido por diferentes isoformas de NO sintase, entre eles a isoforma induzível (iNOS) que é ativado por IFN- γ e TNF- α (BOGDAN, 2001). Durante a infecção por *T. cruzi*, NO pode, direta ou indiretamente, modular a maquinaria leucocitária efetora através de diversos mecanismos. Esse processo envolve efeitos microbicidas derivados de radicais *toxic-free* (peroxinitrito e superóxido) gerados após produção de NO, assim como o aumento da resposta inflamatória induzida durante esse tipo de infecção, um papel duplo na imunidade que é usualmente observada para NO. Essa dualidade na resposta imune, já bem esclarecida, é usualmente dependente da concentração e, uma vez desregulada,

deve induzir toxicidade à célula hospedeira, autoimunidade ou persistência do parasito devido à evasão imune, podendo levar a patologia.

NO é envolvido no controle de parasitemia induzida por *T. cruzi* e diretamente elimina o parasito *in vitro*. NO afeta *T. cruzi* por modificar quimicamente proteínas contendo cisteínas e/ou por ligação à metalo-proteínas que medeiam processos metabólicos cruciais. A faixa de toxicidade de NO é dependente da sensibilidade do parasito, que difere entre as cepas e de acordo com o microambiente fisiológico (GUTIERREZ et al, 2009). Além disso, essa explosão oxidativa em fagócitos ativado resulta da liberação de ROS (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radical hidroxil, via ativação de NADPH oxidase (NOX) e/ou enzimas mieloperoxidases (MPO). Citocinas inflamatórias e ROS são importantes para o controle de *T. cruzi*. Muitas das ROS são altamente reativas e difusíveis e devem ser liberadas em um *milie* extracelular. Enquanto ROS intracelular serve principalmente para a defesa da célula hospedeira contra agentes infecciosos, a liberação extracelular de ROS, quando presente em abundância, diretamente causa danos nos tecidos ao redor ou promove processo inflamatório (GUPTA et al, 2011). Nossos resultados obtidos a partir de camundongos KO para iNOS e gp91 não apresentaram parasitemia durante 30 dias pós-inoculação. Assim, é concebível acreditar que NO e ROS devem ter papéis redundantes durante a eliminação de parasitos. Outra hipótese que não exclui completamente a primeira é de que outros mecanismos de eliminação de parasitos devem ser ativado por parasitos da cepa G, tais como o grupo de agentes induzidos por IFN- γ , que desempenham papel importante no controle de patógenos intracelulares pelo hospedeiro. Esses genes pertencem a família de GTPases de 47- a 48-kDa, por exemplo LRG-47 que pode influenciar o controle de *T. cruzi* da cepa Y pela regulação simultaneamente da atividade microbicida de macrófagos e função hematopoiética (SANTIAGO et al, 2005).

Nossos resultados mostraram o impacto da resposta imune inata no controle da infecção por amastigotas da cepa G. Além disso, nocautes para T CD4⁺ e CD8⁺ não apresentaram diferença no curso de infecção. Essa informação deve representar importantes achados para desenvolver novas estratégias imunes focadas em aumentar a resposta imune inata para controlar a patologia que deve ser causada por diferentes cepas do parasito no mesmo hospedeiro. Para ganhar percepções sobre as fontes de produção de IFN- γ , nós realizamos citometria de fluxo e observamos que a população de linfócitos em amostras do sangue periférico apresentou um fenótipo inativado em

animais infectados ou não. Enquanto que em animais infectados observamos um significativo aumento na população de NK, com fenótipo ativado. Esse resultado sugere que a principal fonte de IFN- γ produzido para proteger o animal contra amastigotas da cepa G são células NK. Entretanto, a depleção de células NK em animais WT e KO para IFN- γ seriam interessantes para confirmar tal hipótese. Em conclusão, nossa pesquisa mostrou que apesar de amastigotas extracelulares da cepa G ser altamente infectivos *in vitro*, não induzem infecção patente *in vivo* devido a sua alta susceptibilidade à produção de IFN- γ no início da infecção. Esse estudo realça a necessidade de se considerarem vieses de cepas quando investigar a resposta imune do hospedeiro contra *T. cruzi*.

Obtendo tais dados, pretendemos, posteriormente, abranger nossas análises e compreensões acerca da resposta imune, agora buscando comparar as duas cepas com infectividades distintas. Pretendíamos, com isso, compreender se tal diferença de infectividade se daria, também, pela distinção entre as respostas, o que enfatizaria os dados já encontrados em nosso primeiro artigo, mas também buscaríamos analisar a diferença do perfil imunológico entre as duas fases da infecção (aguda e crônica), analisando a interferência do sistema imune na indução da cronificação da doença. Além disso, pretendíamos analisar a diferença de tropismo entre as distintas cepas, buscando detectar a migração do parasito em órgãos distintos no decorrer da infecção. Dessa forma, realizamos outro trabalho no qual desenvolvemos uma cinética de infecção com animais que foram infectados com tripomastigotas metacíclicos das cepas G ou CL.

A existência de cepas de *T. cruzi* com tropismos para diferentes tecidos foi descrita por vários trabalhos (VIANNA, 1911; CAMPOS, 1927, TALIAFERRO, PIZZI, 1955; BICE, ZELEDON, 1970; ANDRADE, 1973; HANSON, ROBERSON, 1974, OLIVEIRA et al, 2012). A localização preferencial de *T. cruzi* em certos tecidos ou órgãos como o pâncreas (WATKINS, 1966), bexiga (BICE, ZELEDON, 1970), tecido adiposo (SHOEMAKER et al., 1970), musculatura lisa, esquelética e cardíaca já foram reportadas (BICE, ZELEDON, 1970; TAY et al., 1973; HANSON, ROBERSON, 1974). 16 cepas coletadas na mesa área endêmica no Brasil apresentaram miocardiotropismo, lesões cardíacas proeminentes e infecção baixa no fígado e baço. (ANDRADE, 1973). Então esses dados fornecem evidências de que parasitos de populações distintas de *T. cruzi* são hábeis para invadir órgãos seletivos e tecidos ou evitar sua internalização por tipos específicos celulares.

Tais diferenças no tropismo podem estar relacionadas a distintas moléculas do parasito que interagem distintamente com a célula hospedeira. Sendo assim, provavelmente algumas cepas tem predileção por certo órgão por ser mais favorável a sua interação com determinada célula do que outra. Nesse trabalho usamos duas cepas de *T. cruzi* pertencentes a duas distintas DTUs, G (*T. cruzi* I) e CL (*T. cruzi* VI), com distintos perfis de infectividade (CORTEZ, ATAYDE, YOSHIDA, 2006; FERREIRA et al, 2006).

Observamos tropismos distintos para as duas cepas aqui analisadas. Enquanto a cepa CL teve predileção pelo estômago, e se manteve no sistema gastrointestinal, a cepa G se manteve em partes, mas também acabou por migrar para o tecido cardíaco. Bem ao início da infecção (3h), houve quantidade significativa de ambas as cepas no estômago. Entretanto, observa-se também uma quantidade menor de parasitos das duas cepas no tecido cardíaco e no baço, havendo maior quantidade de CL no coração, e de G no baço (porém sem diferença significativa). Isso também já era esperado pois durante a fase aguda, um número grande de parasitos estão circulantes na corrente sanguínea e todos os tipos de células nucleadas são potenciais alvos de infecção (BRENER,1973; MACEDO, PENA, 1998; FERNANDES, ANDREWS, 2012). No 5º dia de infecção, houve aumento de ambas as cepas, principalmente da CL, no estômago, indicando a replicação de tais parasitos e sua preferência em se manter naquele tecido. Não detectamos parasitos da cepa G ou CL no coração, e no baço observamos somente parasitos da cepa G, porém em menor quantidade que no estômago. A partir do 15º dia, observou-se certa migração da cepa G para o tecido cardíaco, o que indica uma predileção dessa cepa também por esse tecido, diferentemente da cepa CL, que se manteve especialmente no tecido gastrointestinal, tendo predileção pelo estômago. Apesar do aumento progressivo da cepa G no coração (a partir de 15 dias, aumentando aos 3 meses e atingindo seu ápice aos 6M), essa cepa ainda manteve-se, preponderantemente, no estômago. A cepa CL, contudo, nem chegou a migrar, e apenas aumentou progressivamente no estômago, atingindo seu ápice ao final da crônificação (6M). Sendo assim, tais dados sugerem que a cepa CL teve predileção pelo tecido gastrointestinal, se mantendo durante a crônificação nesse tecido, enquanto que a cepa G teve tropismo também pelo tecido cardíaco, se mantendo no coração e estômago durante a sua fase crônica.

Tais dados de cinética de infecção por qPCR foram congruentes com os achados histopatológicos e as análises de citocinas. Em relação à análise histológica, o estômago

apresentou menor processo inflamatório, principalmente durante a fase aguda de infecção (3h, 5D, 15D), o que pode levar a dedução do porque de parasitos de G e CL se manterem alí, por apresentar um local mais propício para seu desenvolvimento. Entretanto houve aumento do processo inflamatório (mesmo não sendo significativo), durante a fase crônica de ambas as cepas, o que condiz com a manutenção das mesmas nesse tecido, que a longo prazo induziriam uma resposta imune mais robusta. Tais dados são corroborados pelas análises de citocinas nas quais observou-se que, apesar de citocinas pró-inflamatórias estarem aumentadas na infecção aguda e crônica por G e CL, houve também aumento de citocinas anti-inflamatórias, as quais estariam regulando a resposta imune, o que levaria a um menor processo inflamatório.

IL-12 é uma citocina pró-inflamatória secretada por macrófagos ativados, uma vez em contato com determinado patógeno. Tal citocina ativa células NK e linfócitos, os quais, em contrapartida, produzem TNF- α e IFN- γ que reativam macrófagos tornando-os mais efetivos em sua resposta anti-patógenos, ao induzir a síntese de óxido nítrico por meio da ativação da enzima iNOS, ou ainda de espécies reativas de oxigênio (ROS), por meio da ativação de NADPH oxidase (NOX), ambos compostos oxigenados extremamente tóxicos para parasitos intracelulares (TRINCHIERI, 2003). A atuação de tais citocinas já é bem relatada na infecção por *T. cruzi*. Um estudo no qual utilizaram camundongos IL-12^{-/-} infectados com *T. cruzi*, observou-se maior suscetibilidade de tais camundongos, que apresentaram aumento de parasitemia e mortalidade (MICHAILOWSKY et al, 2001; MÜLLER et al, 2001). Esses resultados corroboram a atuação de IL-12 como essencial na resposta anti-*T. cruzi* (GRAEFE et al, 2003). Outro trabalho demonstrou diferenças na produção de IL-12 p40 e IFN- γ durante a infecção por duas cepas distintas de *T. cruzi*, assim como diferenças na citotoxicidade de células NK durante a infecção. Apesar das diferenças, na infecção por ambas as cepas tais citocinas estiveram envolvidas na resposta imune contra o protozoário (ANTUNEZ, CARDONI, 2000).

Nossos achados foram congruentes com tais trabalhos, observando o envolvimento de tais citocinas durante a infecção por ambas as cepas no estômago, órgão que teve o contato primário com o parasito. Houve aumento de IL-12 especialmente durante a infecção por CL, o que está provavelmente relacionado a maior quantidade dessa cepa nesse tecido, ou ainda por essa ser mais virulenta que a cepa G. Tal fato foi observado tanto na fase aguda (5D) e crônica (3M), o que condiz com o aumento de IFN- γ e TNF- α na fase aguda (15D e 5D), e de TNF- α na fase crônica dessa

mesma cepa. Na infecção crônica por G (3M e 6M) houve aumento de IFN- γ e TNF- α , entretanto não houve aumento significativo de IL-12. Isso pode ser explicado baseando-se nos dados obtidos anteriormente por nosso grupo (RODRIGUES et al, 2012), nos quais observamos que a cepa G tem baixa infectividade in vivo devido à alta susceptibilidade à resposta imune do hospedeiro, especialmente à resposta inicial promovida por NKs ativadas e produtoras de IFN- γ . Tal resposta é capaz de controlar rapidamente tal cepa, sendo que não seria necessária uma resposta exacerbada de NKs, o que explicaria a não necessidade de se ter um aumento significativo de IL-12.

Para que haja um equilíbrio da resposta imune, há o requerimento do controle de uma resposta exacerbada e a prevenção de reatividade ao próprio e de danos ao hospedeiro. Existem algumas citocinas com atuação regulatória, ou anti-inflamatória, com papel crucial na prevenção de inflamação e de patologias autoimunes. Uma delas é a IL-4, conhecida por definir o fenótipo Th2 em linfócitos e regular a proliferação, apoptose e expressão de diversos genes (CORREN et al, 2011; CHEWINSKI et al, 1987; WILLS-KARP et al, 1998; GRUNIG et al, 1998; ZHU et al, 1999; AVERSA et al, 1993; TONY et al, 1994). IL-4 compartilha sequências homólogas e efeitos funcionais com IL-13, sendo mais potente do que essa segunda (GRÜNIG et al, 2012). Outra citocina anti-inflamatória importante é IL-10, a qual é expressa por distintas células do sistema imune inato e adaptativo, sendo regulatória de respostas imunes diversas, não somente do perfil Th1 como também Th2 (revisado em O'GARRA, VIEIRA, 2007; TRINCHIERI, 2007; MAYNARD, WEAVER, 2008; MALOY, POWRIE, 2001; SARAIVA, O'GARRA, 2010).

Células Th9 são subtipos de células Th recentemente descritas que expressam IL-9 (SPRINGER, 1994). IL-9 pode funcionar como regulador positivo ou negativo da resposta imune. Por exemplo, durante infecções parasitárias, pode ajudar a eliminar o patógeno, porém durante processos de transplantação, pode promover a manutenção do ambiente de tolerância. Em geral, IL-9 parece ter um importante papel durante processos alérgicos e de autoimunidade e um dos principais alvos dessa citocina são mastócitos, ao promover a expansão dessas células (RANKIN et al, 2000).

Apesar de ter havido o aumento de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção por ambas as cepas de *T. cruzi* aqui analisadas (G e CL), também se detectou o aumento de citocinas regulatórias, ou anti-inflamatórias, que promoveriam a regulação dessa resposta imune, impedindo a exacerbção da inflamação. Em nossos resultados observamos que houve aumento de IL-4 e IL-10, principalmente na infecção aguda (5D)

pela cepa CL. IL-13 não fora detectada durante a infecção, muito provavelmente por sua ação estar sendo compensada por IL-4, já que possuem efeitos similares e a segunda citocina mostra-se mais efetiva que a primeira. O aumento dessas citocinas regulatórias pode explicar o fato de ter havido certo controle da resposta inflamatória. Tal regulação deve ter sido um importante fator para a manutenção dos parasitos nesse tecido, os quais obtiveram um ambiente mais propício para sua instalação e, conseqüentemente, cronificação.

Entretanto, durante a fase crônica não se detectou esse aumento, o que pode ter promovido a exacerbação da inflamação, o que levou a um maior recrutado inflamatório e alteração morfológica nesse tecido, corroborando os achados histopatológicos (nos quais visivelmente, mas não significativamente, houve aumento do score durante a fase crônica, principalmente da cepa CL). IL-9 esteve diminuída na infecção por CL, em todos os tempos, e na infecção aguda por G (5D e 15D), indicando que não há atuação significativa da subpopulação Th9 durante a infecção por ambas as cepas.

Nossos resultados são consistentes com trabalhos anteriores nos quais a inativação genética ou neutralização imunológica de IL-10 aumentou a mortalidade e a miocardite aguda em camundongos infectados por *T. cruzi* (HUNTER et al, 1997; HÖLSCHER et al, 2000; ROFFE et al, 2012). Outro grupo de pesquisa examinou o papel de IL-4 na defesa do hospedeiro contra infecção por *T. cruzi* (cepa Tulahuen), ao depletar IL-4 com anticorpo monoclonal para tal citocina. Tanto a parasitemia quanto a mortalidade diminuíram em animais nos quais IL-4 foi depletada, e houve o aumento de IFN- γ e óxido nítrico. Isso sugere que tal citocina induz maior suscetibilidade à infecção pelo parasito, suprimindo a produção de IFN- γ e NO, os quais possuem atividade trypanocida (HIYAMA et al, 2001).¹

Algumas das citocinas da família IL-1 analisadas foram IL-1 α e IL-1 β . IL-1 β é mais estudada porque se assume que ambas tenham papéis similares, por se ligarem e ativarem o mesmo receptor. Entretanto, alguns experimentos usando camundongos deficientes para cada uma dessas citocinas revelaram que elas não possuem papéis tão redundantes (HORAI et al., 1998; KRELIN et al., 2007; MILLER et al., 2007). (NAKAE et al., 2001a; NAKAE et al., 2001b; LUHESHI, ROTHWELL, BROUGH, 2009). As fontes de IL-1 β são monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e NK (DINARELLO, 2009). Tal citocina é descrita como mediador pró-inflamatório, tendo efeito de regular a expressão gênica, incluindo na regulação positiva na secreção

de citocinas, assim como na resposta imune adaptativa, estimulando o desenvolvimento de linfócitos ativados (LUHESHI, ROTHWELL, BROUGH, 2009). Outra propriedade proinflamatória importante de IL-1 β é sua habilidade em aumentar a expressão de moléculas de adesão. Tais propriedades promovem o recrutado de células inflamatórias, tais como neutrófitos e leucócitos IL-1 β também atua como fator angiogênico, tendo papel importante na formação de vasos, auxiliando o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) (VORONOV et al, 2003). Em camundongos deficientes para IL-1 β , VEGF não é capaz de estimular a formação de vasos sanguíneos (DINARELLO, 2009). VEGF é um fator de sobrevivência de células endoteliais, promovendo o crescimento do endotélio vascular derivado de artérias, veias e vasos linfáticos (FERRARA, GERBER, LeCOUTER, 2003).

IL-1 β também atua como fator de estímulo de proliferação de células B, já que IL-1 β media a indução de IL-6. De fato, IL-6 parece sempre estar sob controle de IL-1 β , tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Assim, durante a geração de resposta de Th17, um subtipo de células Th que secretam IL-17 com papel importante na autoimunidade (MIOSSEC, KOLLS, 2012), IL-1 β parece ser essencial, já que regula IL-6 que, em contrapartida, está envolvida na diferenciação desse subtipo de células, juntamente de TGF- β (DINARELLO, 2009).

IL-6 é uma citocina com diferentes papéis na resposta imune. Tal citocina inibe a diferenciação de células Th1, independente de IL-4. Além disso, também interfere na produção de IFN- γ por células T CD4. Ainda, IL-6 em combinação com TGF- β , pode promover a diferenciação de células Th17 (MANGAN et al, 2006). IL-6 também induz a produção de anticorpos por células B, ao mediar a expressão de IL-21, que é a citocina chave para a diferenciação de células B (DIENZ et al, 2009; RINCON, 2012).

As citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-17 estiveram ausentes no estômago. Como todas estão relacionadas entre si, era de se esperar que na ausência de uma, a outra também não fosse detectada. Isso dá indícios do não envolvimento de células Th17 durante a infecção das cepas G e CL no tecido gastrointestinal. VEGF também não foi detectado no estômago, o que também está em congruência com a ausência de IL-1 β , a qual auxilia na atuação desse fator angiogênico.

IL-5 é produzido por células Th2 e mastócitos mediante estímulos do complexo alérgeno-IgE. Células IL-2Ra⁺ na placa de Peyer produzem altos níveis de IL-5, quando estimulados com IL-2. IL-5 induz a diferenciação de células B ativadas em secretoras de anticorpos e aumenta a proliferação e diferenciação de precursores de eosinófilos em

eosinófilos maduros, tanto em camundongos quanto em humanos. Os efeitos de IL-5 em eosinófilos compreendem a sua diferenciação, migração, ativação e sobrevivência (KOURO, TAKATSU, 2009). Essa citocina também age em sinergia com uma quimiocina, eotaxina, induzindo a mobilização de eosinófilos da medula óssea. Essa quimiocina é um quimioatraente de eosinófilos, também induzindo agregação dessas células e elevação no nível de cálcio intracelular. Além disso, eotaxina induz a maior expressão da subunidade de integrina CD11b e aumenta a adesão de eosinófilos à células endoteliais (BURKE-GAFFNEY, HALLEWELL, 1996; RANKIN, CONROY, WILLIAM, 2000).

Nossos resultados mostraram que, muito provavelmente, não houve uma importante atuação de eosinófilos durante a infecção pelas cepas G e CL no estômago, já que IL-5 não fora detectada para nenhuma das cepas, em nenhum dos tempos de infecção, e eotaxina esteve aumentada apenas bem ao início da infecção por G (3h), havendo seu decréscimo em todos os outros tempos, para ambas as cepas. Nossos resultados estiveram de acordo com trabalho realizado por Marini et al (2011), no qual realizaram a vacinação de animais com *T. rangeli*, e posteriormente desafiaram com *T. cruzi*, e analisaram o perfil de citocinas. Observaram que IL-5 não foi detectada, pressupondo que tal citocina não estivesse atuando naquelas circunstâncias (MARINI et al, 2011).

As quimiocinas são proteínas secretadas primariamente por leucócitos, relacionadas por motivos conservados de quatro cisteínas. Essas proteínas foram implicadas em uma variedade de processos inflamatórios, assim como funções imunorregulatórias, especialmente mediando a migração de neutrófilos, linfócitos, células apresentadoras de antígenos, incluindo células dendríticas e da linhagem monocítica. Em resposta a um estímulo inflamatório, quimiocinas coordenam o recrutamento e ativação de leucócitos durante distintas fases, tanto na resposta inata quanto adaptativa (YADAV, SAINI, AROCA, 2010). As superfamílias são classificadas como C-X-C ou C-C; Geralmente, quimiocinas C-X-C, tais como IL-8, KC (CXCL1), proteína inflamatórias de macrófago-2 (MIP-2/ CXCL2), são quimioatraentes potentes e ativadores de neutrófilos, mas não de monócitos, enquanto que quimiocinas C-C, incluindo proteína quimiotática de monócitos humanos-I (MCP-1), RANTES, e proteína inflamatória de macrófagos 1 α e 1 β (MIP-1 α and MIP-1 β) exibem potencial quimioatraente para monócitos, mas não neutrófilos (SCHALL et al, 1993).

Em um estudo, foi explorado o papel de quimiocinas CC, tais como RANTES, MIP1-a, e MIP-1b na atuação de macrófagos citotóxicos contra *T. cruzi*, examinando seu mecanismo de toxicidade ao parasito. Os autores observaram que tais quimiocinas induziram a capacidade microbicida em macrófagos humanos, os quais foram capazes de eliminar o parasito intracelularmente (VILLALTA et al, 1998; VIEIRA et al, 2009). MCP-1(CCL2) é outra quimiocina C-C, produzida por vários tipos celulares, incluindo células epiteliais, endoteliais, de músculo liso, fibroblastos, astrócitos, monócitos e células da micróglia, a qual possui potencial de recrutar monócitos, células T de memória e células dendríticas para sítios de injúria tecidual e infecção (YADAV, SAINI, AROCA, 2010). O papel desta citocina na infecção por *T. cruzi* também foi provado por Paiva *et al* (2009). Tais autores demonstraram que na ausência de MCP-1, células mononucleares não formam infiltrado focal em corações de animais infectados com *T. cruzi*, a carga parasitária era maior, infiltrado inflamatório era composto por menor número de linfócitos T CD8⁺ e macrófagos, células sabidamente importantes para o controle do crescimento do parasito (MARTÍNEZ-DÍAZ et al, 2001).

Nossos resultados foram congruentes com tais achados anteriores, detectando-se aumento de MIP-1 β durante a infecção crônica (6M), mas especialmente durante a fase aguda pela cepa CL (5D), aumento de RANTES durante a infecção crônica (6M) de ambas as cepas, e ainda o aumento de MCP-1 durante a fase aguda (5D) da cepa CL, e crônica (3M e 6M) de G. MIP-1 α teve um aumento apenas na fase crônica (3M) de CL, nos demais tempos e na infecção por G houve diminuição dessa quimiocina, provavelmente por ter sido compensada pela atividade das outras 3 quimiocinas. Dessa forma, podemos deduzir que tais quimiocinas mostram-se muito importantes durante a infecção por *T. cruzi* de ambas as cepas.

Características de quimiocinas CXC é sua habilidade de recrutar especificamente neutrófilos (ROLLINS, 1997; BACON, OPPENHEIM, 1998; ZLOTNIK et al., 1999). Em camundongos, quimiocinas CXC compreendem MIP-2 e KC, as quais são consideradas homólogas à IL-8 humana. MIP-2 e KC são quimiocinas CXC induzíveis por TNF- α (TESSIER et al., 1997; SCHRAMM et al., 2000), os quais são importantes mediadores da ativação e migração de neutrófilos em um largo espectro de doenças (ROVAL, HERSCHMAN, SMITH, 1998; ZHANG et al, 2001; De FILIPPO et al, 2008). A quimiocina CXC induzida por lipopolissacarídeo (LIX) também tem a importante função quimioatraente de neutrófilos e amplificação de cascatas inflamatórias (CHOONG et al, 2004).

As quimiocinas MIG/CXCL9 (monocina induzida por interferon- γ) e IP-10/CXCL10 (proteína-10 interferon-induzível), como o próprio nome diz, são quimiocinas fortemente induzidas por citocinas, particularmente IFN- γ , durante infecção, injúria ou resposta imunoinflamatória. MIG e IP-10 se ligam a receptores primários, CXCR3, e possivelmente a adicionais receptores. Seu papel mais bem conhecido é no tráfico de leucócitos, principalmente atuando em células Th1CD4+, CD8+ T e NK ativadas (RABQUER et al, 2011; MÜLLER et al, 2010). IP-10 tem mostrado ser um biomarcador durante diversas Trypanosomíases humanas africanas (HAT) causadas pela infecção de sub-espécies de *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*), bem como por infecção por *Plasmodium falciparum* (*P.falciparum*) and *Plasmodium vivax* malária, *Toxoplasma gondii* e *Leishmania major* (LIU et al, 2011).

Trabalhos anteriores demonstram a importância de quimiocinas durante a infecção por *T. cruzi*. Em uma pesquisa realizada por Talvani et al (2000), C57BL/6 foram infectados intraperitonealmente com tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* Colombiana, e RNAm foi extraído do tecido cardíaco desses animais. Eles observaram que havia uma dominância de quimiocinas induzidas por IFN- γ , denominadas MIG, RANTES e IP-10. A expressão de MIG, RANTES e IP-10 persistiu até 120 dias p.i. Uma possível explicação para tal observação poderia ser que a infecção por *T. cruzi* elicitou altas concentrações de IFN- γ na circulação que seriam suficientes para estimular tais células no tecido cardíaco a expressar essas quimiocinas. Além de induzir a expressão de RANTES e IP-10, *T. cruzi* também induz a secreção de MIP-1 α , MIP-1 β e KC por macrófagos inflamatórios, e sua expressão também estava aumentada em tecido cardíaco de animais infectados. Em contraste, não detectaram expressão de eotaxina e LIX (TALVANI et al, 2000).

Outros trabalhos observaram que cardiomiócitos infectados por *T. cruzi* produzem quimiocinas CC e CXC *in vitro* e o tratamento com MIP-2/CXCL1-2, MCP-1/CCL2 e IP-10/ CXCL10 sozinhos ou em combinação, induzem a síntese de NO e inibem a multiplicação de parasitos. Além disso, na fase crônica da infecção, quando a carga parasitária é mais escassa, camundongos ainda expressam quantidades significativas de RANTES/CCL5, MIP-1 α /CCL3 e quimiocinas induzidas por IFN γ (TALVANI et al, 2000).

No estômago, MIP-2 teve aumento apenas na infecção aguda por G (3h e 5D), porém não teve aumento durante infecção por CL, havendo apenas uma diminuição dessa no tempo de 3h. LIX não fora detectada para nenhuma das cepas, congruente com

achados anteriores, nos quais não se detectou RNAm para a expressão de tal quimiocina durante infecção por *T. cruzi* (cepa Colombiana) (TALVANI et al, 2000). KC esteve diminuída durante o início da infecção de ambas as cepas (3h e 5D), porém aumentou aos 15D e 3M para a cepa G, e aos 6M para a cepa CL. O aumento de tal quimiocina na fase crônica pode ser devido ao aumento de número de parasitos nesse tecido durante a cronificação, o que pode ter levado à indução de uma reativação da resposta imune, o que é congruente com os dados de citocinas inflamatórias (IL-12, TNF- α e IFN- γ), que também se elevaram na fase crônica. MIG e IP-10 estiveram aumentadas bem ao início da infecção por G e durante a fase crônica de CL.

Os fatores de estimulação de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF; também conhecidos como CSF2), fator de estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF; também conhecido como CSF1) e fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF; também conhecido como CSF3) foram primeiramente definidos por sua habilidade em gerar colônias de células mieloides maduras *in vitro* a partir de precursores da medula óssea. GM-CSF induz a diferenciação e proliferação de granulócitos e macrófagos, M-CSF de macrófagos e G-CSF de granulócitos (FRÉTIER et al, 2002; METCALF, 2010; FRANZKE, 2006).

Interleucina-3 (IL-3) é uma citocina hematopoiética secretada por mastócitos e células T ativadas. É produzida durante processos alérgicos ou em resposta a infecções parasitárias, sendo considerada promotora de resposta Th2. A principal característica de IL-3 é sua capacidade de estimular a proliferação de células tronco hematopoiéticas pluripotentes e células progenitoras, particularmente aquelas da linhagem mieloide, a vários estágios de desenvolvimento. Dessa forma, IL-3 tem sido reconhecida como fator multi-potencial de estimulação de colônias (multi-CSF). IL-3 estimula a geração de macrófagos, basófilos, dentre outros leucócitos na medula óssea de camundongos (SHENG et al, 2014).

Em nossos resultados, observamos aumento de G-CSF e de M-CSF nas fases crônicas de CL (6M), e apenas aumento de M-CSF durante infecção crônica por G (3M). GM-CSF não foi detectada no estômago, provavelmente por ter sua atuação compensada pelos outros dois fatores de diferenciação. A maior detecção de tais fatores na fase crônica pode ter sido devido ao aumento do número de parasitos e sua manutenção naquele tecido, o que levou a uma sensibilização maior da resposta imune do hospedeiro. Além disso, a resposta foi maior para a cepa CL, que encontrava-se em maior predomínio no estômago. Já IL-3 teve aumento durante a fase aguda da infecção

de CL (5D), o que pode ser explicado por esse fator ser multi-potencial, o que levaria a diferenciação de diversas linhagens celulares importantes durante o início de uma infecção. Outros trabalhos já relataram a atuação desses fatores na resposta a *T. cruzi*. Vasconcelos et al (2013) avaliaram se a administração de G-CSF em camundongos com doença de Chagas crônica, iria interferir na quantidade de *T. cruzi* residuais no tecido. Eles realizaram análises de RT-qPCR para quantificar a carga parasitária no coração de camundongos e observaram uma redução significativa naqueles tratados com G-CSF. Também analisaram os efeitos de G-CSF nas culturas de *T. cruzi* e observaram uma diminuição na porcentagem de células infectadas, assim como no número de amastigotas intracelulares. Fontt e Vray (1995) observaram a produção de GM-CSF quando células foram infectadas com *T. cruzi*. Em relação à IL-3, outro estudo foi realizado usando macrófagos infectados com *T. cruzi*. Seguindo à infecção, tripomastigotas extracelulares foram removidos e meio contendo IL-3 foi adicionado. Observaram que o tratamento inibiu significativamente a infecção intracelular (62% de inibição de *T. cruzi*) (HO et al, 1992).

IL-2 é produzida principalmente por células Th CD4⁺ em órgãos linfoides secundários e, em menor extensão, por células T CD8⁺, células NK e NKT. Sua produção por células T CD4⁺ e CD8⁺ T é induzida seguindo a ativação por antígenos, embora a síntese por T CD8⁺ seja comparativamente menor, sempre requerendo o auxílio de células CD4⁺. Essa citocina induz a expansão, contração e geração de memória dessas células (BOYMAN, SPRENT, 2012). IL-15 foi inicialmente identificada por sua habilidade em estimular a proliferação de células T de uma forma dependente de IL-2, através de componentes comuns em seus receptores (IL-2R/15Rb-gc). Similarmente à IL-2, IL-15 parece estimular a proliferação de células T CD4⁻CD8⁻, CD4⁺CD8⁺, CD4⁺ e CD8⁺ ativadas, assim como facilitar a indução de linfócitos T citotóxicos, e a geração, proliferação e ativação de NK (STEEL, WALDMANN, MORRIS, 2012).

Interleucina-7 (IL-7) é uma citocina chave no desenvolvimento inicial de linfócitos T no timo, sendo especialmente produzida pelo epitélio tímico. Entretanto, IL-7 é também importante na promoção de homeostasia de linfócitos T CD4 maduros. Igualmente importante é sua habilidade em prover sinal de sobrevivência para células T maduras, associado ao aumento da expressão de fatores anti-apoptóticos, membros da família Bcl-2 (ZAUNDERS, LERY, SEDDIKI, 2014).

Em nossos resultados detectamos aumento de IL-2 e IL-7 na fase crônica de infecção pela cepa CL. Tais citocinas foram estimuladas apenas pela cepa CL, já que essa cepa se encontrava no estômago em maior significância que a cepa G, ou ainda por essa cepa ser considerada mais virulenta e, portanto, por estimular maior atuação da resposta imune do hospedeiro. Além disso, a maior detecção de IL-2 e IL-7 na fase crônica se deve, provavelmente, porque atuam também em uma fase mais tardia da infecção, estimulando a geração de células T de memória, ou ainda induzindo a homeostasia tardia dessas mesmas células. Não houve detecção de IL-15, provavelmente porque essa possui atuação muito similar à IL-2, o que compensou sua ausência.

De forma geral, no estômago observamos uma maior atuação da resposta imune durante a infecção pela cepa CL, o que já era de se esperar já que essa cepa prevaleceu e preponderou nesse tecido mediante a cepa G, e ainda por essa primeira cepa já ser descrita como mais virulenta, podendo estimular de forma mais intensa a resposta do hospedeiro. Além disso, essas duas cepas tem formas distintas de interagir com a célula hospedeira, especialmente durante uma infecção oral. Sabe-se que tripomastigotas metacíclicos (MT), mas não sanguíneos, tem funções especializadas para invasão de mucosas e eficientemente entram no epitélio da mucosa gástrica (HOFT 1996, HOFT et al. 1996). Quando MT alcançam o estômago, resistem a destruição porque são protegidos por mucinas protease-resistentes gp35/50, abundante na superfície do parasito. Os parasitos se ligam à mucina gástrica através de gp82 e transpassam a mucosa para alcançar células epiteliais. MT da cepa CL de *T. cruzi* invadem eficientemente células epiteliais gástricas através de gp82, induzindo a liberação de Ca^{2+} bidirecionalmente. MT da cepa G devem alcançar as células epiteliais tão efetivamente quanto à cepa CL, mas sua internalização deve ser prejudicada por gp90 (YOSHIDA, 2006).

Em relação ao tecido cardíaco, durante a análise histopatológica observa-se um aumento significativo no processo inflamatório durante a fase crônica da infecção, especialmente da cepa G. Observou-se aumento do escore inflamatório no 15º dia de infecção por G e tal escore foi ainda maior na fase crônica dessa mesma cepa. Tais dados são congruentes com as análises de qPCR, nas quais detectou-se que a cepa G migrou para o coração a partir do 15º dia de infecção e se manteve ali principalmente na fase crônica.

Com relação às análises do perfil de citocinas no tecido cardíaco, de forma geral observa-se uma diminuição de grande parte das citocinas pró-inflamatórias, o que parece contradizer os achados histológicos. Entretanto, também foi detectado aumento de grande parte das quimiocinas, o que pode explicar a elevação de recrutado inflamatório no tecido (como apresentado pelo aumento do escore inflamatório, assim como representado na imagem ilustrativa de um coração infectado com G). Contudo, apesar de ter havido a migração de tais células, essas parecem estar sendo reguladas, pelo aumento de IL-10, o que explicaria a diminuição das citocinas inflamatórias. Tal diminuição também pode ser devido a presença de fatores supressivos do parasito, que já foram previamente reportados. De fato, foi demonstrado que moléculas de *T. cruzi*, tais como SAPA (*Shed acute phase antigen*) exibem uma atividade de regulação da resposta imune, especialmente influenciando na proliferação de linfócitos T. Além disso, estudos recentes tem demonstrado que glicoproteínas da membrana de *T. cruzi* podem inibir a expressão de cadeias de receptores de IL-2 e a secreção de citocinas por subpopulações de linfócitos T humanos ativados. Em outra pesquisa, uma nova molécula de *T. cruzi* foi clonada e sequenciada, Tc52, a qual tem uma atividade supressora da proliferação de células T humanas e murinas (OUAISSI et al, 2001).

Nossos resultados mostram que IL-12, IFN- γ e TNF- α foram diminuídas no coração, havendo um aumento de IL-12 apenas na fase crônica (3M) de CL, e um ligeiro aumento de TNF- α na fase aguda por essa mesma cepa que, contudo, teve sua concentração ainda menor que o controle. Essa diminuição de citocinas pró-inflamatórias pode ser explicada pelo aumento de IL-10, tanto na fase aguda quanto crônica de CL (5D e 3M, respectivamente), assim como na fase crônica de G (3M e 6M). Esse controle da resposta, principalmente durante a fase crônica de G, pode explicar o porque dessa cepa se manter nesse tecido, especialmente nessa fase. O ambiente tornou-se menos hostil e propício para seu estabelecimento ali. Em relação às demais citocinas anti-inflamatórias, IL-4 e IL-13, de forma geral, também estiveram diminuídas nesse tecido (IL-13 não fora detectada), mas muito provavelmente, foram compensadas por IL-10 em sua atuação regulatória. IL-9 também esteve diminuída indicando a não atuação de células Th9 durante essa infecção.

As citocinas IL-1- α , IL-1 β , IL-6 e IL-17 estiveram diminuídas no coração dando indícios de que, similar ao que ocorreu no estômago, no tecido cardíaco também não houve envolvimento de células Th17 durante a infecção das cepas G e CL. Diferentemente do que observamos aqui, outros trabalhos relataram o aumento de

expressão de RNAm de TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , e iNOS no coração de camundongos com 9 dias de infecção por *T. cruzi*, mas não no coração de animais controles. Também detectaram a expressão de TNF- α , IL-1 β , e iNOS em cardiomiócitos (MACHADO et al, 2000).

Entretanto, VEGF esteve diminuído apenas na infecção inicial de ambas as cepas (3h), mas aumentou aos 5D e 6M durante infecção por G, e aos 15D durante infecção por CL, diferentemente do estômago, no qual esse fator esteve diminuído em todos os tempos. O aumento de VEGF mostra-se importante, porque auxilia na formação de endotélio vascular, promovendo o reestabelecimento de vasos sanguíneos em locais danificados. Sabe-se que durante a infecção por *T. cruzi*, principalmente na fase crônica, pode haver lesão do tecido cardíaco, o que provoca toda a sintomatologia da doença cardíaca chagásica. Portanto, espera-se uma resposta do hospedeiro para tentar amenizar tais danos, e VEGF pode auxiliar na renovação tecidual cardíaca, induzindo a formação de novos vasos. Interessante observar a detecção dessa citocina especialmente na infecção por cepa G, a qual foi aquela que migrou para o tecido e que, conseqüentemente, induziria maior injúria ao local.

Fator de inibição de leucemia (LIF) é uma neurocitocina da família de Interleucina-6, produzida especialmente por células de Schwann no sistema nervoso periférico, e astrócitos no sistema nervoso central. É capaz de manter células tronco embrionárias em um estado pluripotente ao promover a auto-renovação ou suprimindo a diferenciação de células-tronco (HE et al, 2006; GRAF, CASANOVA, CINELLI, 2011). Um estudo observou que tal neurocitocina sinergiza com a neuraminidase de *T. cruzi* para resgatar neurônios da morte, já que durante a infecção por tal protozoário há possibilidade de se formarem lesões no sistema nervoso autônomo do coração e do trato gastrointestinal. Tais autores hipotetizaram que a neuraminidase de *T. cruzi*, em colaboração com LIF, serviria para aprimorar a sobrevivência de neurônios em indivíduos infectados. Tal neuroproteção seria vantajosa tanto para o hospedeiro quanto para o protozoário, o qual poderia habitar no ser humano sem produzir significativa degeneração neuronal (CHUENKOVA, PEREIRA, 2000). Interessantemente, em nossos resultados LIF foi detectada apenas no tecido cardíaco, em baixas concentrações. Isso está de acordo com o trabalho mencionado anteriormente, o que nos faz pensar que tal citocina esteja atuando na proteção do tecido cardíaco, especialmente do sistema nervoso nesse tecido.

Em relação à IL-5 e eotaxina, ambas estiveram diminuídas no coração, indicando que não houve uma importante atuação de eosinófilos durante a infecção pelas cepas G e CL nesse tecido, assim como no estômago. Já dentre as quimiocinas analisadas, MIP-1 β , LIX, MCP-1 e MIP-2 não foram detectadas no coração. MIP-1 α esteve diminuída em todos os tempos de infecção de ambas as cepas. Entretanto, houve aumento de RANTES durante a infecção aguda e crônica de CL (3h e 3M), e apenas crônica de G (3M). Tal quimiocina pode ter suprido a ausência de MIP-1 α , MIP-1 β e MCP-1, já que pertencem a mesma família de quimiocinas (C-C), tendo atuações similares, especialmente na indução de recrutamento de monócitos. As quimiocinas pertencentes à família CXC que estiveram aumentadas foram KC, MIG e IP-10. KC esteve aumentado apenas na infecção aguda (3h) por CL, diferentemente de MIG que aumentou apenas na fase crônica de ambas as cepas (3M e 6M). Já IP-10 teve aumento durante a fase aguda de CL (3h), e durante a fase crônica de ambas as cepas (3M e 6M). O aumento de RANTES, KC e IP-10 durante a fase aguda de CL pode ser devido a uma quantidade maior (porém não significativamente distinta de G) de parasitos dessa cepa no tempo de 3h, o que levou à rápida sensibilização e ativação da resposta imune no local. Como a cepa G encontrou-se em maior quantidade apenas a partir de 15D, tal ativação ocorreu especialmente na fase crônica. Diversos trabalhos (TALVANI et al. 2000, ALIBERTI et al. 2001, dos SANTOS et al. 2001, MARINO et al. 2004) tem observado elevados níveis de RNAm de diversas quimiocinas tais como MCP-1, MIP1 α , MIP-1 β , MIG, IP-10 e RANTES, no tecido cardíaco, associado com a formação de infiltrado inflamatório em vários modelos murinos na infecção aguda e crônica de *T. cruzi*. Um estudo feito por Medeiros et al (2009) demonstrou que a miocardite durante a fase aguda e crônica da infecção por *T. cruzi*, é diretamente correlacionada com algumas quimiocinas MIP-1 α e RANTES, mas não com a presença das citocinas IFN- γ e TNF- α no *milieu* cardíaco, reafirmando a participação de quimiocinas na infecção por *T. cruzi* no miocárdio. Tais dados estão de acordo com o que observamos em nosso trabalho, já que detectamos maior nível de algumas quimiocinas no tecido cardíaco, reafirmando sua importância durante o processo inflamatório, entretanto as citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ and TNF- α , também estiveram diminuídas.

Em relação aos fatores de diferenciação, GM-CSF não fora detectado no tecido cardíaco, G-CSF esteve diminuído e somente M-CSF teve aumento na infecção crônica pela cepa G (3M e 6M). Tal aumento se deu na fase crônica de G em congruência com os achados de qPCR, que detectaram maior quantidade de parasitos dessa cepa nesse

tempo de infecção. Além disso, o aumento apenas de M-CSF dá indícios de que as principais células envolvidas durante a infecção seriam macrófagos. IL-3, IL-2 e IL-7 estiveram diminuídas na infecção por ambas as cepas, o que vai de encontro aos demais resultados, que indicam uma diminuição de toda a resposta inflamatória nesse tecido.

O baço foi o órgão que apresentou maior processo inflamatório, como observado nos achados histopatológicos. Isso já era de se esperar, por esse ser um órgão linfóide primário de extrema importância em qualquer processo infeccioso, refletindo a resposta imune sistêmica. Nos tempos iniciais de infecção pela cepa CL, já houve scores de inflamação altos, diferentemente da infecção por G, muito provavelmente porque a primeira cepa é mais virulenta que a segunda, o que demanda uma resposta mais robusta do hospedeiro. A partir do 15º dia houve progressão de inflamação, principalmente na infecção por CL, mas também houve na de G. Aos 3M de infecção, a cepa G induziu significativamente aumento no processo inflamatório, mantendo-o aos 6M. A cepa CL continuou com scores altos aos 6M de infecção. Esse ambiente altamente inflamatório talvez tenha sido a razão dos parasitos não terem se estabelecido em tal órgão, já que uma baixíssima quantidade de ambas as cepas foram detectadas por qPCR no decorrer de toda infecção.

Tais achados histopatológicos foram condizentes com as análises de citocinas, nas quais observamos aumento de grande parte das citocinas pró-inflamatórias, assim como de quimiocinas e fatores de diferenciação, culminando com uma resposta robusta proveniente desse órgão linfóide. Nossos dados mostram que IL-12 esteve aumentada na infecção aguda por CL (5D), e que IFN- γ e TNF- α aumentaram durante a fase crônica de ambas as cepas, principalmente na infecção por CL. O aumento de IFN- γ aqui identificado vai de acordo com trabalhos anteriores, onde foi encontrado que a resistência à infecção aguda, em camundongos C3H, estava relacionada à produção inicial de IFN- γ no baço (ANTUNEZ, CARDONI, 2000). Houve detecção de IL-1 β apenas nesse tecido, infectado pela cepa CL (fase aguda e crônica), o que é algo extremamente condizente, já que tal citocina tem papel importante na resposta imune adaptativa pela estimulação no desenvolvimento de linfócitos ativados. IL-1 α , entretanto, esteve diminuída, especialmente na fase aguda de ambas as cepas, provavelmente por ser compensada por IL-1 β . IL-6 elevou-se apenas aos 6M p.i. por CL, entretanto não houve detecção de IL-17, o que realmente indica a não participação de uma subpopulação de Th17 na infecção por tais cepas de *T. cruzi*. VEGF esteve diminuído em todos os tempos de infecção. Contrariando o que detectamos aqui,

trabalhos anteriores detectaram expressão de IL-17 durante infecção por *T. cruzi*. Em camundongos não infectados, a porcentagem de células no baço expressando IL-17 foi baixa (0.2%), mas após infecção houve aumento na porcentagem de células produtoras de IL-17 nesse mesmo órgão (PETERSEN, BURLEIGH, 2003).

Houve também atuação de citocinas anti-inflamatórias, que estariam regulando a resposta no baço e, conseqüentemente, mais sistemicamente. IL-10 esteve aumentado na infecção aguda de CL, enquanto IL-4 esteve aumentado na infecção crônica dessa mesma cepa. Sendo assim, ambas tornaram o ambiente regulatório, em ambas fases da infecção, auxiliando a evitar uma exacerbação da resposta inflamatória. Já IL-9 aumentou na fase crônica de ambas as cepas (3M e 6M), indicando a possibilidade da atuação de células Th9 durante a cronificação da doença.

IL-5 pareceu aumentar durante infecção aguda por CL (5D e 15D), entretanto tal aumento não fora significativo. Já eotaxina esteve diminuída, indicando a não participação de eosinófilos na infecção.

Em relação às quimiocinas analisadas, observou-se que grande parte delas (MIP-1 α , MIP-1 β , MIG e IP-10) esteve aumentada apenas na fase crônica da infecção por CL (excetuando-se IP-10 que também aumentou na fase crônica de G). Isso demonstra que houve uma reativação do processo inflamatório durante a cronificação da infecção, devido a manutenção e estabelecimento dos parasitos em determinados órgãos do hospedeiro (especialmente o estômago) principalmente pela cepa CL, que é mais virulenta que G. MIG e IP-10 aumentaram na fase crônica de CL, o que condiz com o aumento de IFN- γ também durante essa fase, já que tais quimiocinas são induzidas principalmente pela presença de IFN- γ . KC mostrou ter atuação mais durante a infecção por G, já que houve seu aumento apenas durante infecção crônica por essa cepa.

Em relação aos fatores de diferenciação, houve aumento de GM-CSF na infecção aguda e crônica de CL, e de M-CSF na infecção aguda de CL e crônica de G. IL-3 aumentou somente na infecção crônica por CL. IL-2 aumentou apenas na fase crônica de ambas as cepas, enquanto que IL-7 aumentou apenas na infecção por CL, aguda e crônica. Percebe-se que há maior indução de tais fatores principalmente na infecção por CL, especialmente na fase crônica. Entretanto também observou-se aumento de M-CSF na infecção crônica por G, fase na qual tal cepa também encontra-se em maior quantidade e já estabelecida em dois tecidos do hospedeiro (estômago e coração). Já se esperava o aumento de IL-2 e IL-7 nesse tecido, já que tal órgão constitui-se majoritariamente de linfócitos, os quais são influenciados por ambas

citocinas para sua expansão, contração, geração de memória e manutenção de homeostase.

A fase aguda da doença de Chagas representa o primeiro contato entre o parasito e o hospedeiro, e o momento no qual a resposta imunológica será ativada. Os eventos imunológicos que irão se suceder durante a fase aguda irão influenciar o desenvolvimento da doença em uma fase crônica patogênica ou protetiva. A maioria dos indivíduos que entram na fase crônica se mantem na fase indeterminada, a qual é assintomática e representa um excelente exemplo de equilíbrio entre o parasito e o hospedeiro. A fase assintomática e indeterminada da doença de Chagas tem sido associada com a predominância na produção de citocinas regulatórias, tais como IL-10, e a diminuição na secreção de citocinas inflamatórias, tais como IFN- γ and TNF- α . Assim, é possível que a habilidade de produzir IL-10 mais ao final da fase aguda da doença seja importante para controlar a resposta e permitir a cronificação da doença. É notável que um fino balanço entre citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias e uma resposta celular efetiva necessita ser alcançado para manter a carga parasitária baixa, assim como impedir o dano tecidual (ANDRADE, GOLLOB, DUTRA, 2014).

Nesse trabalho observamos exatamente a atuação de uma resposta inflamatória em conjunção com um perfil também regulatório. Observamos que no estômago, o órgão no qual os parasitos tiveram contato inicial, houve a secreção de citocinas pró-inflamatórias, em resposta à esse primeiro contato parasito-hospedeiro. Entretanto também houve a secreção de citocinas regulatórias, tais quais IL-10 e IL-4, as quais regularam a inflamação e permitiram que tal órgão se tornasse um ambiente propício para a manutenção dos parasitos de ambas as cepas. A presença de citocinas regulatórias pode ter induzido o início do processo de cronificação. Entretanto, já na fase crônica detectou-se um ambiente mais inflamatório do que regulatório, o que dá indícios de que a doença possa ter sido sintomática, ocasionado manifestação gastrointestinal da doença. Já no tecido cardíaco, houve preponderância de um ambiente mais anti-inflamatório, durante todas as fases da infecção, o que nos permite pressupor que, mesmo havendo migração da cepa G para tal tecido, não tenha havido sintomatologia de uma doença cardíaca crônica.

Em conclusão, observamos aqui o diferente tropismo entre cepas distintas de *T. cruzi*, a partir de uma cinética de infecção desde a fase aguda até a cronificação. A cepa CL manteve-se preponderantemente no estômago, desde a fase inicial até a crônica, e acabou por induzir uma resposta mais robusta que a cepa G, provavelmente devido à

sua maior infectividade (já pré-estabelecida). Já a cepa G manteve-se em grande parte no estômago, entretanto, no 15º dia migrou para o coração, mantendo-se nos dois tecidos durante sua fase crônica (com maior prevalência no estômago). Os achados histopatológicos e análises de citocinas demonstraram diferenças entre as respostas provenientes da infecção por cada uma das cepas. Observou-se uma maior resposta inflamatória no baço, reforçando a sua importante atuação durante uma infecção, como indutor de resposta local e sistêmica. O coração teve alto recrutado inflamatório, devido à atuação importante de quimiocinas, entretanto muito provavelmente as células recrutadas não estariam promovendo seu efeito inflamatório, ou estariam sendo reguladas, já que as citocinas pró-inflamatórias estavam reguladas nesse tecido. O estômago demonstrou ter uma resposta balanceada, entre citocinas pró e anti-inflamatórias, que culminaram em um ambiente mais propício para a manutenção dos parasitos de ambas as cepas.

Além disso, na detecção de citocinas e quimiocinas observamos que, durante a infecção por CL, altas quantidades de KC foram detectadas no tecido cardíaco. Por outro lado, tal fenótipo não foi observado durante a infecção por G. A cepa G, portanto, parece ter encontrado outro ambiente também favorável para seu estabelecimento e, talvez por sua baixa virulência, tenha ativado em menor proporção a resposta imune do hospedeiro. Resultados similares foram observados no baço. Nesse caso, a presença de altas concentrações de KC durante a fase aguda deve ter controlado a infecção de ambas as cepas nesse tecido, o que justifica a baixa detecção de DNA dos parasitos. Corroborando nossa hipótese de que KC possui um impacto significativo no controle da multiplicação dos parasitos, 3 meses pós-infecção não fora detectado DNA da cepa G no estômago, o que vai de acordo com o aumento de KC nesse órgão nesse tempo de infecção.

KC é uma quimiocina recrutadora de neutrófilos, os quais são envolvidos no início de uma resposta frente a um patógeno, sendo essenciais componentes da resposta imune inata. Devido a sua habilidade de produzir e secretar diversos mediadores solúveis, os neutrófilos devem participar na regulação da resposta inflamatória. Pouco ainda se sabe sobre o papel dos neutrófitos durante a infecção por *T. cruzi* (LUNA-GOMES et al., 2014). Alguns autores já demonstraram a atuação dessas células no controle de *Leishmania* spp. (de SOUZA et al., 2010). Nesse sentido, pretendemos propôr a importância do estudo do papel de neutrófilos e da quimiocina KC durante a infecção por *T. cruzi*. Importantes achados poderão surgir a partir de tais análises.

Como outra vertente de nosso grupo de pesquisa, buscamos compreender o papel biológico da proteína P21 de *T. cruzi*, caracterizada por Silva et al (2009) e cuja forma recombinante, P21-His₆ pode ser facilmente obtida *in vitro*, a qual utilizamos em nossos experimentos. Nesse trabalho avaliamos o potencial de P21-His₆ em aumentar o processo fagocítico, além de identificar seu possível receptor, assim como a sinalização intracelular ativada por meio de sua ligação na célula hospedeira. Nossos resultados mostraram que P21-His₆ é capaz de aumentar a fagocitose de uma forma dependente da ligação à CXCR4, induzindo a polimerização do citoesqueleto de actina por meio da ativação da via envolvendo PI3-quinase. A atividade pró-fagocítica de P21-His₆ não depende nem do tempo de incubação como da concentração da proteína. Observamos também que, tanto o uso de anticorpo policlonal anti-P21-His₆, da proteína desnaturada, de tratamento com polimixina e uso de macrófagos derivados de animais nocautes para toll-4, confirmaram que a atividade pró-fagocítica observada em diferentes ensaios foi devido à proteína recombinante, e não à possíveis resíduos de LPS, provenientes do extrato de bactérias. Experimentos realizados sem o bloqueio de receptores FcR, mostraram aumento da fagocitose, provavelmente devido à ligação cruzada de FcR por imunocomplexos.

O rearranjo de actina durante a fagocitose cria protrusões na membrana que englobam materiais extracelulares. O citoesqueleto de actina também dá suporte para processos de invaginação de segmentos da membrana para o citoplasma, alongação de invaginação, cisão de novas vesículas da membrana plasmática, e movimento de vesículas a partir da membrana (MOOREN et al, 2012). De acordo com isso, a polimerização de actina em macrófagos induzida por P21-His₆ foi demonstrada por citometria de fluxo. Tais resultados suportam nossos achados, já que P21-His₆ induziu a polimerização de actina nos tempos estudados e tal atividade foi completamente abolida seguindo o tratamento com anti-P21-His₆ e bloqueio de FcR de macrófagos.

Voltando nossa atenção para a via de sinalização que estaria sendo ativada por P21-His₆, na sua interação com macrófagos peritoneais, nossos resultados, usando inibidores diversos para as distintas vias de sinalizações, mostraram que a atividade de P21-His₆ baseia-se na via de PI3-quinase, de forma independente de AKT. Tal resultado intrigante é suportado por outros estudos (VASUDEVAN et al, 2009; LEE et al, 2011). Estudos tem demonstrado que a transdução de sinais da família de Rho GTPases dependente de PI3K ocorre durante fagocitose mediada por FcR e que a desativação de Cdc42 dependente de PI3-K é necessária para o processo de fagocitose. Além disso, a

atividade de PI3-K e de Cdc42 são ligadas: Cdc42 ativada por FcR estimula PI3-K, a qual leva a um aumento nas concentrações de PI(3,4,5)P3 na região fagocítica, permitindo a desativação de Cdc42 dependente de PI(3,4,5)P3, que é necessária para completar o processo fagocítico (BEEMILLER et al, 2010). Em adição, um estudo forneceu importantes evidências na ativação de PI3-kinase durante a invasão celular por *T. cruzi* (WOOLSEY et al, 2003). Nós também observamos uma pequena diferença estatística durante a fagocitose de zimosan por macrófagos que foram previamente tratados com inibidores de m-Tor e ERK2 na presença de P21-His₆. Além disso, a proteína recombinante mostrou ter uma alta atividade pró-fagocítica. Assim, esses resultados indicam que tais vias de sinalização não devem ser tão relevantes para o processo biológico induzido por P21-His₆.

Considerando a variedade de receptores celulares de superfície, nós hipotetizamos que Receptores acoplados à proteína G (GPCRs) poderiam ser o receptor da célula hospedeira para P21-His₆, de acordo com estudos recentemente publicados (RIYAHY et al, 2011; ELVIN et al, 2004). Nós realizamos experimentos usando macrófagos peritoneais de camundongos nocautes para CCR4 e com inibidor para CXCR4. Nossos resultados em experimentos usando inibidor para CXCR4 mostraram que esse pode ser o receptor de P21-His₆ em macrófagos. Assim como qualquer receptor acoplado à proteína G, o mecanismo de ativação de CXCR4 é mediado por acoplar a proteína G heteromérica intracelularmente na superfície interna da membrana plasmática (GOLDSMITH, DHANOSEKARAN, 2007). A sinalização de CXCR4 durante a quimiotaxia, adesão, sobrevivência celular e proliferação tem sido demonstrada por envolver PI3-quinase, AKT, MAPK, a via ativada por Ras e o complexo *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) (MELLADO et al, 2001; BARBEIRO et al, 2003; BENDALL et al, 2005; DELGADO-MARTÍN et al, 2011). Por outro lado, a via de sinalização ativada durante fagocitose dependente de CXCR4 não é conhecida, já que esse é o primeiro resultado considerando esse receptor como mediador de um processo fagocítico. Tais questões serão melhor investigadas em trabalhos posteriores de nosso grupo.

A técnica de DNA recombinante permitiu que cientistas preparassem grandes quantidades de proteínas baseadas nas nativas. Esse estudo revelou que P21 pode ser um importante fator de evasão de *T. cruzi* da resposta imune do hospedeiro. A atividade pró-fagocítica de P21 deve permitir que o parasito se mantenha intracelularmente, onde pode romper o compartimento do fagolisossomo e crescer livremente no citoplasma da

célula hospedeira. Além disso, uma atividade já conhecida da proteína recombinante pode ser uma ferramenta para cientistas para estudar fagocitose. Juntos, esses resultados mostram que P21-His₆ aumenta a fagocitose e a remodelação do citoesqueleto de actina, ao se ligar no receptor CXCR4 e ativar a via de PI3-k. Ainda, a atividade da proteína recombinante esclarece a possível atividade da proteína P21 nativa de *T. cruzi*, em regular o escape do parasito da resposta do hospedeiro dando a chance do parasito circulante em invadir a célula hospedeira e se multiplicar no citoplasma.

Ao buscarmos integrar essas duas vertentes de trabalho, analisamos dados obtidos anteriormente em nosso laboratório. Foi observado que proteínas associadas à polimerização de actina desempenham um papel duplo durante a infecção *in vitro* por amastigotas extracelulares das cepas G e CL. Verificou-se que a polimerização de actina mediada por ARF6 (*ADP-ribosylation factor-6*), Anexina A2 e N-WASP é de extrema importância para a invasão celular. Por outro lado, a ausência de qualquer uma destas proteínas é suficiente para propiciar um ambiente favorável à multiplicação intracelular dos amastigotas. Este resultado sugere a possibilidade de que a polimerização do citoesqueleto de actina durante a infecção por *T. cruzi* possui um papel importante no controle da replicação do parasita e, por conseguinte, na propagação da doença. Desta forma, acreditamos que após a fase aguda da doença de Chagas, fatores (citocinas, quimiocinas ou outras moléculas) liberados pelo hospedeiro induzam uma maior polimerização de actina na célula infectada para silenciar a infecção. Outra hipótese que não exclui a primeira, seria a de que o parasita por meio de controle de expressão gênica possa evitar a resposta do hospedeiro induzindo uma maior expressão de proteínas que atuam diretamente na polimerização da actina do hospedeiro. Neste contexto, a proteína P21 poderia estar atuando nesse sentido, já que identificamos seu potencial na indução da polimerização do citoesqueleto de actina.

Neste contexto, alguns trabalhos já estão sendo desenvolvidos em nosso laboratório buscando verificar o papel do citoesqueleto de actina durante a infecção experimental. Estes estudos buscam analisar se componentes do sistema imune, bem como a proteína P21, poderiam induzir a polimerização de actina em linhagens celulares. Em trabalho realizado por uma mestrandia de nosso laboratório (MARTINS, dados não publicados), macrófagos e mioblastos foram infectados com *T. cruzi* e após 96 horas foram tratados com IFN- γ ou P21-His₆ para análise de multiplicação parasitária, bem como de polimerização de actina (por imunofluorescência e citometria de fluxo). Martins observou que, tanto as células tratadas com IFN- γ quanto com P21-

His₆ tiveram menor multiplicação parasitária em relação aos controles (sendo essa diminuição bem mais relevante para IFN- γ). Os dados obtidos por imunofluorescência e citometria estão em processo de análise. Outras abordagens também realizadas no laboratório demonstraram que a forma recombinante da P21 tem atividade quimiotática, capacidade de ativar macrófagos e neutrófilos e alta atividade anti-angiogênica (Machado, 2013).

Como perspectivas futuras pretendemos analisar a expressão de P21, bem como de proteínas envolvidas na dinâmica do citoesqueleto de actina (WASP, ARP-2, gelsolina, AFAP-1, AFAP-111, cofilina, cortactina, ezerina, ARP-3, profilina-1, 2, 3,4, moesina, formina-1, fascina) em tecidos de animais infectados com G e CL em uma cinética de infecção (fases aguda e crônica). Tais tecidos, como estômago, baço e coração, já foram coletados em fases distintas da infecção oral por ambas as cepas (3 horas, 5 dias, 15 dias, 3 meses e 6 meses). O material está conservado em meio para preservação de RNA, para sua posterior extração e realização de RT-PCR. Os primers para P21, bem como para as demais proteínas já foram desenhados e adquiridos.

8.0 CONCLUSÃO

- Amastigotas extracelulares da cepa G não induzem infecção patente *in vivo* devido a sua alta susceptibilidade à produção de IFN- γ no início da infecção;
- Houve diferença no tropismo entre as distintas cepas, sendo que a cepa CL manteve-se preferencialmente no estômago, tanto na fase aguda quanto crônica, e a cepa G manteve-se no estômago no decorrer de toda a infecção, mas também foi capaz de infectar o tecido cardíaco, principalmente no processo de cronificação;
- A quimiocina KC parece exercer um importante papel no controle da infecção, podendo interferir no curso da mesma, assim como na possível migração dos parasitos.
- P21-His₆ modula a fagocitose e a remodelação do citoesqueleto de actina, ao se ligar no receptor CXCR4 e ativar a via de PI3-k.

9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ADL et al. The Revised Classification of Eukaryotes. **J. Eukaryot. Microbiol.**, n. 59, v. 5, p. 429–493, 2012.

AKBARI, O., DE KRUYFF, R.H., UMETSU, D.T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 725–731, 2001.

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

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

ALIBERTI, J. C.; SOUTO, J. T.; MARINO, A. P.; LANNES-VIEIRA, J.; TEIXEIRA, M. M.; FARBER, J.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Pathol**, v. 158, n. 4, p. 1433-40, 2001.

ALMEIDA-DE-FARIA, M., FREYMÜLLER, E., COLLI, W., ALVES, M.J.M. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. **Exp Parasitol**, v. 92 n. 263–274, 1999.

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

ALVES, M. J.; COLLI, W. Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosomacruzi* with host structures. **Sub cell Biochem**, v. 47, p. 58–69, 2008.

AMARAL, C. F. S., TAFURI, W. L.; BRENER, Z. Frequencia do parasitismo encefalico em camundongos inoculados experimental-mente cor diferentes cepas do *T. cruzi*. **Rev Soc Brasil Med Trop**, v. 9,p. 243-246, 1975.

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, issue 7, 2014.

ANDRADE, L. O.; GALVÃO, L. M. C.; NAZARETH, M.; MEIRELLES, S. L.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J.; MACEDO, A. M. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 834-837, 2010.

ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R.; CHIARI, E.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Mol Biochem Parasitol**, v. 100, p. 163-172, 1999.

ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R.; CHIARI, E.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Exp Parasitol**, v. 100, p. 269-275, 2002.

ANDRADE, S. **Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Reconcavo Baiano**. Tese. Universidade da Bahia, Brasil 123 p, 1973.

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

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

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

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

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

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

ANGHEBEN, A.; ANSELMINI, M.; GOBBI, F.; MAROCCO, S.; MONTEIRO, G. Chagas disease in Italy: breaking an epidemiological silence. **Euro Surveill**, v. 16, 2011.

ANTAS, P. R. Z., MEDRANO-MERCADO, N., TORRICO, F., UGARTE-FERNADEZ, R., GÓMEZ, F. Early, intermediate, and late acute stages in Chagas'

disease: a study combining anti-galactose IgG, specific serodiagnosis, and polymerase chain reaction analysis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 61, p. 308–314, 1999.

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

ANTUNEZ, M. I.; CARDONI, R. L. IL-12 and IFN-g production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Immunology Letters**, v. 71, p. 103–109, 2000.

ARCE-FONSECA, M.; BALLINAS-VERDUGO, M. A.; REYES, P. A.; ARANDA-FRAUSTRO, A.; MONTEÓN, V. M. Autoantibodies to human heart conduction system in Chagas' disease. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v.5, n.3, p. 233-6, 2005.

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

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

AVERSA G, PUNNONEN J, COCKS BG, DE WAAL MALEFYT R, VEGA F, JR., ZURAWSKI SM, ZURAWSKI G AND DE VRIES JE. An interleukin 4 (IL-4) mutant protein inhibits both IL-4 or IL-13- induced human immunoglobulin G4 (IgG4) and IgE synthesis and B cell proliferation: support for a common component shared by IL-4 and IL-13 receptors. **J Exp Med**, v. 178, p. 2213-2218, 1993.

BACON, K.B.; OPPENHEIM, J. J. Chemokines in disease models and pathogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 9, p.167-173, 1998.

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

BARBERO, S.; BONAVIA, R.; BAJETTO, A. Stromal cell-derived factor 1 α stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. **Cancer Res**, v. 63, v. 1969–74, 2003.

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

BARRIAS, E. S.; CARVALHO, T. M. U.; De SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. **Frontiers in Immunology Microbial Immunology**, v. 4, n. 186, 2013.

BARRIAS, E. S.; DUTRA, J. M. F.; DE SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U. Participation of macrophage membrane rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 363, n. 3, p. 828–34, 2007.

BASTOS, C. J.; ARAS, R.; MOTA, G.; REIS, F.; DIAS, J. P. Clinical outcomes of BEACHEY, E. H. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. **Journal of Infectious Disease**, v. 143, p. 325-345, 1981.

BASTOS, C. J.; ARAS, R.; MOTA, G.; REIS, F.; DIAS, J. P.; De JESUS, R. S.; FREIRE, M. S.; De ARAÚJO, E. G.; PRAZERES, J.; GRASSI, M. F. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral

transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, 2010.

BEEMILLER, P.; ZHANG, Y.; MOHAN, S.; LEVINSOHN, E.; GAETA, IA Cdc42 Activation Cycle Coordinated by PI 3-Kinase during Fc Receptor-mediated Phagocytosis. **MolBiol Cell**, v. 21, p. 470–480, 2010.

BENDALL, L. J.; BARAZ, R.; JUAREZ, J.; SHEN, W.; BRADSTOCK, K. F. Defective p38 mitogen-activated protein kinase signaling impairs chemotactic but not proliferative responses to stromal-derived factor-1a in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Res**, v. 65, p. 3290–8, 2005.

BERN, C.; KJOS, S.; YABSLEY, M. J.; MONTGOMERY, S. P. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. **Clin Microbiol Ver**, v. 24, p. 655–681, 2011.

BICE, D. E.; ZELEDON, R. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). **J Parasitol**, v. 56, p. 663-670, 1970.

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

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat Immunol**, v. 2, p. 907–916, 2001.

BOSCARDIN, S. B.; TORRECILHAS, A. C.; MANARIN, R.; REVELLI, S.; REY, E. G. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **J Cell Mol Med**, v. 14, p. 1373–1384, 2010.

BOYMAN, O.; SPRENT, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. **Nature reviews immunology**, v. 12, 2012.

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

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

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

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

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

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

BRODSKYN, C., PATRICIO, J., OLIVEIRA, R., LOBO, L., ARNHOLDT, A., MENDONCA-PREVIATO, L. Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 3736–3743, 2002.

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

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

BURKE-GAFFNEY, A.; HELLEWELL, P.G. Eotaxin stimulates eosinophil adhesion to human lung microvascular endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 227, p. 35–40, 1996.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca²⁺-signaling factor for mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 5172–5180, 1995a.

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

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

BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; FRASCH, A. C.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, p. 229–236, 2006.

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

CAMPOS, E. S. Estudos sobre uma raça neurotrópica de *Trypanosoma cruzi*. **Ann Fac Med**, v. 2, p. 197-201, 1927.

CAMPOS, M. A., ALMEIDA, I. C., TAKEUCHI, O., AKIRA, S., VALENTE, E. P., PROCOPIO, D. O, Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **J. Immunol**, v. 167, p. 416–423, 2001.

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

CHAUSSABEL, D., PAJAK, B., VERCRUYSSSE, V., BISSEYE, C., GARZE, V., HABIB, M. Alteration of migration and maturation of dendritic cells and T-cell depletion in the course of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Lab Invest**, v. 83, p. 1373-1382, 2003.

CHERWINSKI, H. M., SCHUMACHER, J. H., BROWN, K. D.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. **J Exp Med**, v. 166, p. 1229-1244, 1987.

CHOONG, M. L.; YONG, Y. P.; TAN, A. C. L.; LUO, B.; LODISH, H. F. LIX: a chemokine with a role in hematopoietic stem cells maintenance. *Cytokine*, v. 25, p. 239-245, 2004

CHUENKOVA, M. V.; PEREIRA, M. A. A Trypanosomal Protein Synergizes with the Cytokines Ciliary Neurotrophic Factor and Leukemia Inhibitory Factor to Prevent Apoptosis of Neuronal Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 1487–1498, 2000.

CHUENKOVA, M. V.; PEREIRA, M. A. A Trypanosomal Protein Synergizes with the Cytokines Ciliary Neurotrophic Factor and Leukemia Inhibitory Factor to Prevent Apoptosis of Neuronal Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 1487–1498, 2000.

CORREN, J., LEMANSKE, R.F., HANANIA, N. A., KORENBLAT, P. E., PARSEY, M. V., ARRON, J. R., HARRIS, J. M., SCHEERENS, H., WU, L. C., SU, Z., MOSESOVA, S., EISNER, M. D., BOHEN, S. P.; MATTHEWS, J. G. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. **N Engl J Med**, v. 365, p.1088-1098, 2011.

CORTEZ, M., ATAYDE, V., YOSHIDA, N. Host cell invasion mediated by *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 is associated with F-actin disassembly and is inhibited by enteroinvasive *Escherichia coli*. **Microbes Infect**, v. 8, p. 1502–1512, 2006.

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

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

CRUZ, M. C.; SOUZA-MELO, N.; SILVA, C. V.; Da-ROCHA, W. D.; BAHIA, D. *Trypanosoma cruzi*: role of δ -amastin on extracellular amastigote cell invasion and differentiation. **Plos One**, 2012.

CUNHA-NETO, E., COELHO, V., GUILHERME, L., FIORELLI, A., STOLF, N., KALIL, J.. Autoimmunity in Chagas' disease: identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. **J. Clin. Investig**, v. 98, p. 1709–1712, 1996.

DAMASCENO, F. S.; BARISÓN, M. J.; PRAL, E. M. F.; PAES, L. S.; SILBER, A. M. Memantine, an Antagonist of the NMDA Glutamate Receptor, Affects Cell Proliferation, Differentiation and the Intracellular Cycle and Induces Apoptosis in *Trypanosoma cruzi*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, issue 2, 2014.

DE ARAÚJO, F. F., CORRÊA-OLIVEIRA, R., ROCHA, M. O., CHAVES, A. T., FIUZA, J. A. Foxp3+CD25 (high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. **Immunobiology**, v. 217, p. 768–777, 2012.

de BARTOLOMEIS, A.; SARAPPA, C.; BUONAGURO, E. F.; MARMO, F.; ERAMO, A. Different effects of the NMDA receptor antagonists ketamine, MK-801, and memantine on postsynaptic density transcripts and their topography: Role of Homer signaling, and implications for novel antipsychotic and pro-cognitive targets in psychosis. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 46, p. 1–12, 2013.

De FILIPPO, K.; HENDERSON, R. B.; LASCHINGER, M.; HOGG, N. Neutrophil Chemokines KC and Macrophage-Inflammatory Protein-2 Are Newly Synthesized by Tissue Macrophages Using Distinct TLR Signaling Pathways. **Journal of Immunology**, v. 180, p. 4308-4315, 2008.

DE SMEDT, T., PAJAK, B., MURAILLE, E., LESPAGNARD, L., HEINEN, E., DE BAETSELIER, P., ET AL. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide *in vivo*. **J. Exp. Med.**, v. 184, p. 1413–1424, 1996.

DE SOUZA CARMO, E. V.; KATZ, S.; BARBIÉRI, C. L. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. **PLoS One**, v. 3, n. 5, 2010.

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

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

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **Int J Cell Biol**, v. 29, 2010.

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

DELGADO-MARTÍN, C.; ESCRIBANO, C.; PABLOS, J. L.; RIOL-BLANCO, L.; RODRÍGUEZ-FERNANDEZ, J. L. Chemokine CXCL12 uses CXCR4 and a signaling core formed by bifunctional Akt, extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2, and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) proteins to control chemotaxis and survival, **J Biol Chem**, v. 286, p. 37222–36, 2011.

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

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

DIENZ, O. et al The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells. **J. Exp. Med**, v. 206, p. 69–78, 2009.

DINARELLO, C. A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 519–50, 2009.

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

dos REIS, G. A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 2, p. 84-90, 2011.

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

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

DUQUE, M. D., CAMPS, P., TORRES, E., VALVERDE, E., SUREDA, F. X. New oxapolycyclic cage amines with NMDA receptor antagonist and trypanocidal activities. **Bioorg Med Chem**, v. 18, p. 46–57, 2010.

DUTRA, W. O.; MENEZES, C. A.; VILLANI, F. N.; DA COSTA, G. C.; DA SILVEIRA, A. B. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 208–218, 2009.

DUZ, A. L. C.; VIEIRA, P. M. A.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; CARDOSO, J. M. O.; OLIVEIRA, F. C. B.; REIS, L. E. S.; TAFURIL, W. L.; VELOSO, V. M.; REIS, A. B.; CARNEIRO, C. M. The TcI and TcII *Trypanosoma cruzi* experimental infections induce distinct immune responses and cardiac fibrosis in dogs, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 8, p. 1005-1013, 2014.

ELVIN, S. J.; WILLIAMSON, E. D.; SCOTT, J. C.; SMITH, J. N.; PÉREZ DE LEMA, G. Evolutionary genetics: Ambiguous role of CCR5 in *Y. pestis* infection. *Nature*, v. 30, n. 6998, p. 417, 2004.

ERDMANN, H.; ROßNAGEL, C.; BÖHME, J.; IWAKURA, Y.; JACOBS, T.; SCHAIBLE, U. E.; HÖLSCHER, C. IL-17A promotes macrophage effector mechanisms against *Trypanosoma cruzi* by trapping parasites in the endolysosomal compartment. **Immunobiology**, v. 218, p. 910–923, 2013.

ESPER, L.; UTSCH, L.; SORIANI, F. M.; BRANT, F.; ARANTES, R. M. E.; CAMPOS, C. F.; PINHO, V.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M.; TANOWITZ, H. B.; VIEIRA, L. Q.; MACHADO, F. S. Regulatory effects of IL-18 on cytokine profiles and development of myocarditis during *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and Infection**, v. 16, p. 481-490, 2014.

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

ESPINOZA, B.; SOLORZANO-DOMÍNGUEZ, N.; VIZCAINO-CASTILLO, A.; MARTÍNEZ, I.; ELIAS-LÓPEZ, A. L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. A. Gastrointestinal Infection with Mexican TcI *Trypanosoma cruzi* strains: Different Degrees of Colonization and Diverse Immune Responses. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 7, n. 9, p. 1357-1370, 2011.

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

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

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, p. 734–747, 2012.

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

FERNANDES, O.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; PINHO, A. P.; MOREL, C. M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; JANSEN, A. M. The complexity of the sylvatic

cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. **Parasitology**, v. 118, p. 161–166, 1999.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LeCOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature medicine**, v. 9, n. 6, 2003.

FERREIRA, D.; CORTEZ, M.; ATAYDE, V. D.; YOSHIDA, N. Actin Cytoskeleton-Dependent and -Independent Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi* Is Mediated by Distinct Parasite Surface Molecules. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 10, p. 5522–5528, 2006.

FERREIRA, E. R.; BONFIM-MELO, A.; MORTARA, R. A.; BAHIA, D. *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes and host cell signaling: more pieces to the puzzle. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 2, 2012.

FONTT, E. O.; VRAY, B. Relationship between granulocyte macrophage-colony stimulating factor, tumour necrosis factor- α and *Trypanosoma cruzi* infection of murine macrophages. **Parasite Immunology**, v. 17, p.: 135-141, 1995.

FRANZKE, A. The role of G-CSF in adaptive immunity. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 17, p. 235–244, 2006.

FRÉTIER, S.; BESSE, A.; DELWAIL, A.; GARCIA, M.; MOREL, F.; LEPRIVEY-LORGEOT, V.; WIJDENES, J.; PRALORAN, V.; LECRON, J. C. Cyclosporin A inhibition of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) production by activated human T lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, 2002.

GAZZINELLI RT, O.S.; WALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur J Immunol**, v. 22, p. 2501–2506, 1992.

GIORDANENGO, L., FRETES, R., DIAZ, H., CANO, R., BACILE, A., VOTTERO-CIMA, E., GEA, S. Cruzipain induces autoimmune response against skeletal muscle and tissue damage in mice. **Muscle Nerve**, v. 23, p. 1407–1413, 2000.

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

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

GOLDSMITH, Z. G.; DHANASEKARAN, D. N. G protein regulation of MAPK networks. **Oncogene**, v. 26, p. 3122–42, 2007.

GRAEFE, S. E.; JACOBS, T.; GAWORSKI, I.; KLAUENBERG, U.; STEEG, C.; FLEISCHER, B. Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to *Trypanosoma cruzi* in mice. **Microbes Infect**, v. 5, p. 833-9, 2003.

GRAF, U.; CASANOVA, E. A.; CINELLI, P. The Role of the Leukemia Inhibitory Factor (LIF) — Pathway in Derivation and Maintenance of Murine Pluripotent Stem Cells. **Genes**, v. 2, p. 280-297, 2011.

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

GRÜNIG, G. CORRY, D. B.; REIBMAN, J.; WILLS-KARP, M. Interleukin 13 and the evolution of asthma therapy. **Am J Clin Exp Immunol**, v.1, n. 1, p. 20-27, 2012.

GRUNIG, G., WARNOCK, M., WAKIL, A. E., VENKAYYA, R., BROMBACHER, F., RENNICK, D. M., SHEPPARD, D., MOHRS, M., DONALDSON, D. D., LOCKSLEY, R. M.; CORRY, D. B. Requirement for IL-13 Independently of IL-4 in Experimental Asthma. *Science*, v. 282, p. 2261-2263, 1998.

GUPTA, S.; DHIMAN, M.; WEN, J. J.; GARG, N. J. ROS signalling of inflammatory cytokines during *Trypanosoma cruzi* infection. **Adv Parasitol**, v. 76, p. 153–70, 2011.

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

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

HANSON, W. L.; ROBERSON, E. L.. Density of parasites in various organs and the relation to numbers of trypomastigotes in the blood during acute infections of *Trypanosoma cruzi* in mice. **J Protozool**, v. 21, p. 512-517, 1974.

HE, Z.; LI, J.; ZHEN, C.; FENG, L.; DING, X. Effect of leukemia inhibitory factor on embryonic stem cell differentiation: implications for supporting neuronal differentiation. **Acta Pharmacologica Sinica** , v. 27, n. 1, p. 80–90, 2006.

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

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

HO, J. L.; REED, S. G.; SOBEL, J.; ARRUDA, S.; HE, S. H.; WICK, E. A.; GRABSTEIN, K. H. Interleukin-3 induces antimicrobial activity against *Leishmania*

amazonensis and *Trypanosoma cruzi* and tumoricidal activity in human peripheral blood-derived macrophages. **Infection and immunity**, v. 60, n. 5, p. 1984-1993, 1992.

HOFT, D. F. Differential mucosal infectivity of different life stages of *Trypanosoma cruzi*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 55, p. 360–364, 1996.

HOFT, D. F., FARRAR, P. L., KRATZ-OWENS, K.; SHAFFER, D. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. **Inf Immun**, v. 64, p. 3800–3810, 1996.

HÖLSCHER, C., MOHRS, M., DAI, W. J., KÖHLER, G., RYFFEL, B., SCHAUB, G. A, MOSSMANN, H.; BROMBACHER, F. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 4075–4083, 2000.

HÖLSCHER, C.; KÖHLER, G.; MÜLLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G. A. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infect Immun**, v. 66, p. 1208–1215, 1998.

HORAI, R., ASANO, M., SUDO, K., KANUKA, H., SUZUKI, M. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-1 α/β , and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1 β is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. **J. Exp. Med**, v. 187, p. 1463–75, 1998.

HORIUCHI, S. et al. Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, p. 1945–1948, 1994.

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

HUNTER, C. A., ELLIS-NEYES, L. A., SLIFER, T., KANALY, S., GRUNIG, G., FORT, M., RENNICK, D., ARAUJO, F. G. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol**, v. 158, p. 3311–3316. 1997.

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

JEFFERY, C. J. Moonlighting proteins—na update. **Mol.Biosyst**, v. 5,p. 345–350, 2009.

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

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

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 511-517, 2010.

KIERSZENBAUM, F.. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. **Clin. Microbiol. Rev**, v. 12, p. 210–223, 1999.

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

KLESHCHENKO, Y. Y.; MOODY, T. N.; FURTA, K. V. A.; OCHIENG, J.; LIMA, M. F.; VILLALTA, F. Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. **Infect Immun**, v. 72, n. 11, p. 6717–21, 2004.

KOURO, T.; TAKATSU, K. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. **International Immunology**, v. 21, No. 12, p. 1303–1309, 2009.

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

KRELIN, Y., VORONOV, E., DOTAN, S., ELKABETS, M., REICH, E. Interleukin-1 β -driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. **Cancer Res**, v.67, p.1062–71, 2007.

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

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

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. **Cell**, v. 106, p. 263–266, 2000.

LEE, E.; KIM, N.; KANG, K. H.; KIM, J. W. Phosphorylation/inactivation of PTEN by Akt-independent PI3K signaling in retinal pigment epithelium. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 414, n. 2, p. 384–389, 2011.

LEON, J. S., AND D. M. ENGMAN. 2003. **The contribution of autoimmunity to**

LEON, J. S., ENGMAN, D. M.. Autoimmunity in Chagas heart disease. **Int. J. Parasitol**, v. 31, p. 554–560, 2001.

LEON, J. S.; DANIELS, M. D.;TORIELLO, K. M.; WANG, K.; ENGMAN, D. M. A Cardiac Myosin-Specific Autoimmune Response Is Induced by Immunization with *Trypanosoma cruzi* Proteins. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3410–3417, 2004.

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

LIPTON, A. S. The molecular basis of memantine action in Alzheimer's disease and other neurologic disorders: low-affinity, uncompetitive antagonism. **Curr Alzheimer Res**, v. 2, p. 155–165, 2005.

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

LIU, M.; GUO, S.; HIBBERT, J. M.; JAIN, V.; SINGH, N.; WILSON, N. O.; STILES, J. K. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 22, p. 121–130, 2011.

LUHESHI, N. M.; ROTHWELL, N. J.; BROUGH, D. Dual functionality of interleukin-1 family cytokines: implications for anti-interleukin-1 therapy. **Journal of Pharmacology**, v. 157, p. 1318–1329, 2009.

LUNA-GOMES, T.; FILARDY, A. A.; ROCHA, J. D.; DECOTE-RICARDO, D.; LAROCQUE-DE-FREITAS, I. F.; MORROT A, BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIANETO, H. C.; DOSREIS, G. A.; NUNES, M. P.; FREIRE-DE-LIMA, C. G. Neutrophils increase or reduce parasite burden in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages, depending on host strain: role of neutrophil elastase. **PLoS One.**, v. 5, n. 9, 2014.

LYKENS, J. E.; TERRELL, C. E.; ZOLLER, E. E.; DIVANOVIC, S.; TROMPETTE, A. Mice with a selective impairment of IFN-gamma signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN-gamma-activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections in vivo. **J Immunol**, v. 184, p. 877–885, 2010.

MACEDO, A.M.; PENA, S. D. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. **Parasitol Today**, v. 14, p. 119–124, 1998.

MACHADO, F. C.; CRUZ, L.; da SILVA, A. A.; CRUZ, M. C.; MORTARA, R. A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SILVA, C. V. Recruitment of galectin-3 during cell invasion and intracellular trafficking of *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes. *Glycobiology*, v. 24, n. 2, p. 179-84, 2013.

MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C. S.; MESTRINER, F. L. A. C.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. *Trypanosoma cruzi*-Infected Cardiomyocytes Produce Chemokines and Cytokines That Trigger Potent Nitric Oxide-Dependent Trypanocidal Activity. **Circulation**, v.102, p. 3003-3008, 2000.

MAILLIARD, R. B.; ALBER, S. M.; SHEN, H.; WATKINS, S. C.; KIRKWOOD, J. M.; HERBERMAN, R. B. IL-18-induced CD83 β CCR7 β NK helper cells. **J. Exp Med**, v.202, p. 941-53, 2005.

MALECKAR, J. R., KIERSZENBAUM, F. Inhibition of mitogen-induced proliferation of mouse T and B lymphocytes by bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, v. 130, p. 908-911, 1983.

MALOY, K. J.; POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nature Immunol**, v. 2, p. 816–822, 2001.

MANGAN, P.R. et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. **Nature**, v. 441, p. 231–234, 2006.

MANOEL-CAETANO, F. DA S.; SILVA, A. E. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. **Cad Saúde Pública**, v. 23, n. 10, p. 2263-74, 2007.

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**, v. 106, n. 1, p. 32-37, 2011.

MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMÕES, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109-23, 2007.

MARTIN, D. L., WEATHERLY, D. B., LAUCELLA, S. A., CABINIAN, M. A., CRIM, M. T., SULLIVAN, S. CD8⁺ T-cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 77, 2006.

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

MAYNARD, C. L.; WEAVER, C. T. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T_Hcell-mediated immune regulation. **Immunol. Rev.**, v. 226, p. 219–233, 2008.

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

MEDEIROS, G. A.; SILVÉRIO, J. C.; MARINO, A. P. M. P.; ROFFE, E.; VIEIRA, V.; KROLL-PALHARES, K.; CARVALHO, C. E.; SILVA, A. A.; TEIXEIRA, M. M.; LANNES-VIEIRA, J. Treatment of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice with a CCR1/CCR5 antagonist (Met-RANTES) results in amelioration of cardiac tissue damage. **Microbes and Infection**, v 11, p. 264-273, 2009.

MEDRANO-MERCADO, N., LUZ, M. R., TORRICO, F., TAPIA, G., VAN LEUVEN, F. Acute-phase proteins and serologic profiles of chagasic children from na endemic area in Bolivia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 54, p. 154–161, 1996.

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

MELLADO, M.; RODRIGUEZ-FRADE, J. M.; MANES, S.; MARTINEZ, A. C. Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 397–421, 2001.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue Tropism of Different *Trypanosoma cruzi* Strains. **The Journal of Parasitology**, v. 64, n. 3, p. 475-482, 1978.

METCALF, D. The colony-stimulating factors and câncer. **Nature reviews câncer**, v. 10, n. 425, 2010.

MICHAILOWSKY, V., SILVA, N.M., ROCHA, C.D., VIEIRA, L.Q., LANNES-VIEIRA, J., GAZZINELLI, R.T. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection, **Am. J. Pathol**, v. 159, p. 1723–1733, 2001.

MINOPRIO, P. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? **Int J Parasitol**, v. 31, p. 588–591, 2001.

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

MIOSSEC, P.; KOLLS, J. K. Targeting IL-17 and Th17 cells in chronic inflammation. **Nature reviews**, v. 11, 2012.

MIYAZAKI, Y., HAMANO, S., WANG, S., SHIMANOE, Y., IWAKURA, Y., YOSHIDA, H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol*, v. 185, p. 1150–1157, 2010.

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

MOOREN, O. L.; GALLETTA, B. J.; COOPER, J. A. Roles for actin assembly in endocytosis. **Annu Rev Biochem**, v. 81, p. 661–686, 2012.

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

MÜLLER, M.; CARTER, S.; HOFER, M. J.; CAMPBELL, I. L. Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity – a tale of conflict and conundrum. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 36, p. 368–387, 2010.

MÜLLER, U., KOHLER, G., MOSSMANN, H., SCHAUB, G.A, ALBER, G., DI SANTO, J.P., BROMBACHER, F., HÖLSCHER, C., IL-12-independent IFN-gamma production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18, **J. Immunol**, v. 167, p. 3346–3353, 2001.

NAGAJYOTIC, H. I. F.; WEISS, L. M.; SILVER, D. L.; DE SRUISSEAU, X. M. S.; SCHERER, P. E.; HERZ, J. *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 2, 2011.

NAKAE, S., ASANO, M., HORAI, R., IWAKURA, Y. Interleukin-1 β , but not interleukin-1 α , is required for T-cell-dependent antibody production. **Immunology**, v. 104, p. 402–9, 2001.

NAKAMURA, K.; OKAMURA, H.; WADA, M.; NAGATA, K.; TAMURA, T. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. **Infect Immun**, v. 57, p. 590-5, 1989.

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

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

NEU, N., K. W. BEISEL, M. D. TRAYSTMAN, N. R. ROSE, AND S. W. CRAIG. Autoantibodies specific for the cardiac myosin isoform are found in mice susceptible to coxsackievirus B3-induced myocarditis. **J. Immunol**, v. 138, p. 2488– 2492, 1987.

NÓBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; OBARA, M. T.; COSTA, E. Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit, **Brazil**. **Emerg Infect Dis**, v. 15, p. 653–655, 2009.

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

O’GARRA, A.; VIEIRA, P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nature Rev. Immunol.**, v. 7, p. 425–428, 2007.

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

OLIVEIRA, A. C.; PEIXOTO, R. J; ARRUDA, L. B; CAMPOS, M. A; GAZZINELLI, R. T. Expression of functional TLR-4 confers pro-inflammatory responsiveness to

Trypanosoma cruzi glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. **Journal of Immunology**, v. 173, p. 5688–5696, 2004.

OLIVEIRA, L. R. C.; PICKA, M. C. M.; NICOLETE, V. C.; CALVI, S. A.; MARCONDES-MACHMARADO, J. Organ tropism during the acute and chronic phases of *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c mice. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.18, issue 1, p. 34-43, 2012.

OUAISSI, A.; SILVA, A. C.; GUEVARA, A. G.; BORGES, M.; GUILVARD, E.; *Trypanosoma cruzi*-induced host immune system dysfunction: a rationale for parasite immunosuppressive factor(s) encoding gene targeting. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 1, n.1, p.11–17, 2001

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

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

PAIVA, C. N.; FIGUEIREDO, R. T.; KROLL-PALHARES, K.; SILVA, A. A.; SILVÉRIO, J. C.; GIBALDI, D.; PYRRHO, A. S.; BENJAMIM, C. F.; LANNES-VIEIRA, J.; BOZZA, M. T. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, 2009.

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

PAVETO, C.; PEREIRA, C.; ESPINOSA, J.; MONTAGNA, A. E.; FARBER, M. The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, v. 270, p. 16576–16579, 1995.

PETERSEN, C. A.; BURLEIGH, B. A. Role for Interleukin-1 β in *Trypanosoma cruzi*-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4441–4447, 2003.

PONCINI, C. V.; GIMÉNEZ, G.; PONTILLO, C. A.; ALBA-SOTO, C. D.; De ISOLA, E., L. D.; PIAZZÓN, I.; CAPPÀ, S. M. G. Central role of extracellular signal-regulated kinase and Toll-like receptor 4 in IL-10 production in regulatory dendritic cells induced by *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Immunology**, v. 47, p. 1981–1988, 2010.

PONCINI, C.V., ALBA SOTO, C.D., BATALLA, E., SOLANA, M.E., GONZÁLEZ CAPPÀ, S.M. *Trypanosoma cruzi* induces regulatory dendritic cells *in vitro*. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 2633–2641, 2008.

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

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

PUREN, A. J.; RAZEGHI, P.; FANTUZZI, G.; DINARELLO, C. A. Interleukin-18 enhances lipopolysaccharide-induced interferon-gamma production in human whole blood cultures. **J Infect Dis**, v. 178, p.1830-4, 1998.

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

RABQUER, B. J.; TSOU, P.S.; HOUL, Y.; THIRUNAVUKKARASU, E.; HAINES, K.; IMPENS, A. J.; PHILLIPS, K.; KAHALEH, B.; SEIBOLD, J. R.; KOCH, A. E. Dysregulated expression of MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 and CXCL16 and their receptors in systemic sclerosis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 13, 2011.

RANKIN, S. M.; CONROY, D. M.; WILLIAMS, T. J. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. **Molecular Medicine Today**, v. 6, 2000.

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

RINCON, M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. **Trends in Immunology**, v. 33, No. 11, 2012.

RIYAH, T.; FRESE, F.; STEINERT, M.; OMOSIGHO, N. N.; GLOCKNER, G. RpkA, a highly conserved GPCR with a lipid kinase domain, has a role in phagocytosis and anti-bacterial defense. **PLoS ONE**, v. 6, p. 27311, 2011.

RODRIGUES, A. A.; SAOSA, J. S. S.; SILVA, G. K.; MARTINS, F. A.; SILVA, A. A.; NETO, C. P. S. S.; HORTA, C. V.; ZAMBONI, D. S.; SILVA, J. S.; FERRO, E. A. V.; SILVA, C. V. IFN- γ Plays a Unique Role in Protection against Low Virulent *Trypanosoma cruzi* Strain. **PLOS Neglected Tropical diseases**, v. 6, issue 4, 2012.

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

ROFFE, E.; OLIVEIRA, F.; SOUZA, A. L. S.; PINHO, V.; SOUZA, D. G.; SOUZA, P. R. S.; RUSSO, R. C.; SANTIAGO, H. C.; ROMANHA, A. J.; TANOWITZ, H. B.; VALENZUELA, J. G.; TEIXEIRA, M. M. Role of CCL3/MIP-1 α and CCL5/RANTES during acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 669-676, 2010.

ROFFE, E.; ROTHFUCHS, A. G.; SANTIAGO, H. C.; MARINO, A. P. M. P.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; ECKHAUS, M.; ANTONELLI, L. R. V.; MURPHY, P. M. The Journal of Immunology IL-10 Limits Parasite Burden and Protects against Fatal Myocarditis in a Mouse Model of *Trypanosoma cruzi* Infection. **Journal of Immunology**, v. 188, p. 649-660, 2012.

ROLLINS, B. J. Chemokines. **Blood**, v. 90, p. 909–928, 1997.

ROPERT, C., GAZZINELLI, R.T. Regulatory role of Toll-like receptor 2 during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Endotoxin Res.*, v. 10, p. 425–430, 2004.

ROVAI, L. E.; HERSCHMAN, H. R.; SMITH, J. B. The murine neutrophil-chemoattractant chemokines LIX, KC, and MIP-2 have distinct induction kinetics, tissue distributions, and tissue-specific sensitivities to glucocorticoid regulation in endotoxemia. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, 1998.

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

SANTIAGO, H. C.; FENG, C. G.; BAFICA, A.; ROFFE, E.; ARANTES, R. M. Mice Deficient in LRG-47 Display Enhanced Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* Infection Associated with Defective Hemopoiesis and Intracellular Control of Parasite Growth. *J Immunol*, v. 175, p. 8165–8172, 2005.

SARAIVA, M.; O’GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature reviews Immunology**, v. 10, n 171, 2010.

SATHLER-AVELAR, R.; LEMOS, E. M.; REIS, D. D.; MEDRANO-MERCADO, N.; ARAÚJO-JORGE, T. C Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Scand J Immunol**, v. 58, p. 655–663, 2003.

SCHALL, T. J.; BACON, K.; CAMP, R. D. R.; KASPARI, J. W.; GOEDDEL, D. V. Human Macrophage Inflammatory Protein α (MIP-1 α) and MIP-1 β Chemokines Attract Distinct Populations of Lymphocytes. **J. Exp. Medicine**, v. 177, p 1821-1825, 1993.

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

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

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

SCHENKMAN, S.; DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V. ATTACHMENT OF *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. **Exp Parasitol**, v. 72, n. 1, p.76–86, 1991.

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

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

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

SCHRAMM, R., LIU, Q.; THORLACIUS, H. Expression and function of MIP-2 are reduced by dexamethasone treatment *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.**, v. 131, p. 328-334, 2000.

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

SHENG, K. C.; HERRERO, L. J.; TAYLOR, A.; HAPPEL, A. J.; MAHALINGAM, S. IL-3 and CSF-1 Interact to Promote Generation of CD11c⁺ IL-10-Producing Macrophages. **PLOS ONE**, v. 9, issue 4, 2014.

SHOEMAKER, J. P.; HOFFMAN, R. V. JR.; HUFFMAN, D. G. *Trypanosoma cruzi*: preference for brown adipose tissue in mice by the Tulahuen strain. **Exp Parasitol**, v. 27, p. 403- 407, 1970.

SIBLEY, L. D.; ANDREWS, N. W. Cell invasion by unpalatable parasites. **Traffic**, v. 1, n. 2, p.100–6, 2000.

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

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

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

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

SOUZA, P. E., ROCHA, M. O., MENEZES, C. A., COELHO, J. S., CHAVES, A. C. *T. cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. **Infect Immun**, v. 75, p. 1886–1894, 2007.

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v. 76, p. 301–314, 1994.

STEEL, J. C.; WALDMANN, T. A.; MORRIS, J. C. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in câncer. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 1, 2012.

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

STEINMAN, R.M., HAWIGER, D., NUSSENZWEIG, M.C. Tolerogenic dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol**, v. 21, p. 685–711, 2003.

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

TALIAFERRO, W. H.; PIZZI, T. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. **J Infect Dis**, v. 96, p. 199- 226, 1955.

TALVANI, A.; RIBEIRO, C. S.; ALIBERTI, J. C. S.; MICHAILOWSKY, V.; SANTOS, P. V. A.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; ALMEIDA, I. C.; FARBERF, J.; LANNES-VIEIRA, J.; SILVA, J. S. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN- γ as importante determinants of chemokine mRNA expression. during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes and Infection**, v. 2, p, 851–866, 2000.

TANOWITZ, H. B., L. V. KIRCHHOFF, D. SIMON, S. A. MORRIS, L. M. WEISS, M. WITTNER. Chagas' disease. **Clin. Microbiol. Rev**, v. 5, p. 400–419, 1992.

TARDIEUX, I.; NATHANSON, M. H.; ANDREWS, N. W. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*- induced cytosolic free Ca²⁺ transients. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, p. 1017-1022, 1994.

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

TARLETON, R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, p. 550–554, 2001.

TAY, J.; GUTIERREZ, Q. M.; SALAZAR-S, P. M.; CASTILLO, M.; ORTEGA, G. M. Estudios sobre seis cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inv Salud Publica (Mex)**, v. 33, p. 67-76, 1973.

TESSIER, P.A., NECCACHE, P.H., CLARK-LEWIS, I., GLADUE, R.P., NEOTE, K.S.; MCCOLL, S.R. Chemokine networks *in vivo*: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation *in vivo* in response to TNF-alpha. **J. Immunol.**, v. 159, p. 3595-3602, 1997.

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

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

TOMLINSONS, PONTES DE CARVALHO, L. C.; VANDEKERCKHOV, E. F.; NUSSENZWEIG, V. Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. **J Immunol**, v. 153, n. 7, p. 3141–7, 1994.

TONY, H. P., SHEN, B. J., REUSCH, P.; SEBALD, W. Design of human interleukin-4 antagonists inhibiting interleukin-4-dependent and interleukin-13-dependent responses in T-cells and B-cells with high efficiency. **Eur J Biochem**, v. 225, p. 659-665, 1994.

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

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 239–243, 2007.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature reviews immunology**, v. 3, n. 133, 2003.

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

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

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Trop**, v. 115, p. 55–68, 2010.

VASCONCELOS, J. F.; SOUZA, B. S. F.; LINS, T. F. S.; GARCIA, L. M. S.; KANETO, C. M.; SAMPAIO, G. P.; ALCÂNTARA, A. C.; MEIRA, C. S.; MACAMBIRA, S. G.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. Administration of granulocyte colony-stimulating factor induces immunomodulation, recruitment of T

regulatory cells, reduction of myocarditis and decrease of parasite load in a mouse model of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **The FASEB Journal**, v. 27, 2013

VASUDEVAN, K. M.; BARBIE, D. A.; DAVIES, M. A.; RABINOVSKY, R.; MCNEAR, C. J. AKT-independent signaling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer. **Cancer Cell**, v. 16, n. 1, p. 21–32, 2009.

VERHASSELT, V., BUELENS, C., WILLEMS, F., DE GROOTE, D., HAEFFNER-CAVAILLON, N., GOLDMAN, M., Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. **J. Immunol.**, v. 158, p. 2919–2925, 1997.

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

VIEIRA, J. L.; SILVERIO, J. C.; PEREIRA, I. R.; VINAGRE, N. F.; CARVALHO, C. M. E.; PAIVA, C. N.; SILVA, A. A. Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors - how to make a dream come true. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 226-235, 2009.

VILLALTA, F.; SMITH, C.; RUIZ-RUANO, R.; LIMA, M. F. A ligand that *Trypanosoma cruzi* uses to bind to mammalian cells to initiate infection. **FEBS Letters**, v. 505, p. 383–388, 2001.

VILLALTA, F.; ZHANG, Y.; BIBB, K. E.; KAPPES, J. C.; LIMA, M. F. The Cysteine-Cysteine Family of Chemokines RANTES, MIP-1a, and MIP-1b Induce Trypanocidal Activity in Human Macrophages via Nitric Oxide. **Infection and Immunity**, v. 66, no. 10, p. 4690–4695, 1998.

VORONOV, E., SHOUVAL, D. S., KRELIN, Y., CAGNANO, E., BENHARROCH, D. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, p. 2645–50, 2003.

WATKINS, R.. Comparison of infections produced by two strains of *Trypanosoma cruzi* in mice. **J Parasitol**, v. 52, p. 958-961, 1966.

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

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

WILLS-KARP, M., LUYIMBAZI, J., XU, X., SCHOFIELD, B., NEBEN, T. Y., KARP, C. L.; DONALDSON, D. D. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. **Science**, v. 282, p. 2258-2261, 1998.

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

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

World Health Organization (WHO) Tropical Disease Research. Program for research and training tropical disease (TDR). Fact sheet Nu340. Geneva: World Health Organization, 2013.

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

YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, p. 1570–1579, 2010.

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

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 1, p. 87-111, 2006.

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

YOSHIDA, N.; BLANCO, S. A.; ARAGUTH, M. F.; RUSSO, M.; GONZÁLEZ, J. The stagespecific 90-Kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 39, p. 39–46, 1990.

ZAUNDERS, J. J.; LEVY, Y.; SEDDIKI, N. Exploiting differential expression of the IL-7 receptor on memory T cells to modulate immune responses. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, p. 391–401, 2014.

ZHANG, M., TANG, H., GUO, Z., AN, H., ZHU, X., SONG, W., et al. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. **Nat. Immunol.**, v. 5, p. 1124–1133, 2004.

ZHANG, X. W.; LIU, Q.; WANG, Y.; THORLACIUS, H. CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration *in vivo*. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, p. 413-421, 2001.

ZHU, Z., HOMER, R. J., WANG, Z., CHEN, Q., GEBA, G. P., WANG, J., ZHANG, Y.; ELIAS, J. A. Pulmonary expression. of interleukin-13 causes inflammation, mucus

hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. **J Clin Invest**, v. 103, p.779-788, 1999.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends *T. cruzi* I to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1051–1054, 2009.

ZLOTNIK, A., MORALES, J.; HEDRICK, J.A. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit. Rev. Immunol.*,v. 19, p. 1-47, 1999.

ANEXO I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 052/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 105/10

Projeto Pesquisa: "Estudos do papel do citoesqueleto de actina, de citocinas e da proteína P21 de T. cruzi na evolução para a fase crônica da doença de chagas experimental".

Pesquisador Responsável: Cláudio Vieira da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

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

Uberlândia, 17 de maio de 2011

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA/UFU

ANEXO II- Artigo com o qual colaborei



OPEN

SUBJECT AREAS:

MOLECULAR
CONFORMATION

PARASITE BIOLOGY

Received
16 January 2014Accepted
13 February 2014Published
4 March 2014

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.E.M. (claudia.munte@ifsc.usp.br); E.H. (horjales@ifsc.usp.br) or C.V.D.S. (silva_cv@yahoo.com.br)

* These authors contributed equally to this work.

A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*

Marlus Alves dos Santos^{1*}, Francesco Brugnera Teixeira^{2*}, Heline Hellen Teixeira Moreira², Adele Aud Rodrigues¹, Fabrício Castro Machado¹, Tatiana Mordente Clemente¹, Paula Cristina Brigido¹, Rebecca Tavares e. Silva¹, Cecílio Purcino¹, Rafael Gonçalves Barbosa Gomes¹, Diana Bahia^{3,4}, Renato Arruda Mortara³, Claudia Elisabeth Munte², Eduardo Horjales² & Claudio Vieira da Silva¹

¹Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil, ²Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil, ³Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo - EPM/UNIFESP, SP, Brasil, ⁴Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais-ICB/UFMG, Minas Gerais, Brasil.

Structural studies of proteins normally require large quantities of pure material that can only be obtained through heterologous expression systems and recombinant technique. In these procedures, large amounts of expressed protein are often found in the insoluble fraction, making protein purification from the soluble fraction inefficient, laborious, and costly. Usually, protein refolding is avoided due to a lack of experimental assays that can validate correct folding and that can compare the conformational population to that of the soluble fraction. Herein, we propose a validation method using simple and rapid 1D ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) spectra that can efficiently compare protein samples, including individual information of the environment of each proton in the structure.

Heterologous expression of proteins in *Escherichia coli* is the most widespread technique used to produce large amounts of protein for structural studies. However, a sufficient quantity of protein is not always obtained using common, native, non-denaturant protocols. Major problems associated with rapid and high-level expression in bacteria include protein aggregation and formation of inclusion bodies¹. In some structural genomics projects^{2,3}, approximately 40% of the expressed targets are found in the insoluble fraction. Although these proteins are usually discarded as viable targets, the use of a simple refolding protocol could resolve the problem. Often, the fraction of soluble protein is not sufficient to make the production of large amounts of protein viable, and, in these cases, use of a refolding protocol can be the best solution to increase protein yield. Several techniques have been applied to refold proteins⁴⁻⁶, but the problem of how to solubilize and correctly fold proteins remains a major issue. One of the main difficulties in using refolded proteins is that there are very few experiments that discriminate between different conformational states and guarantee the correct refolding of the protein. Enzymatic⁷⁻¹⁰ and biological activity¹¹⁻¹³ have been widely used to confirm correct protein refolding. However, in general, significant statistical error is associated with these assays, and the structural integrity of the refolded sample cannot be ensured. With respect to direct analysis of protein structure, circular dichroism (CD) is an effective technique only when large changes in secondary structure are present.

High resolution structural studies can be hindered by low yields of expressed protein or lack of an optimized production/purification protocol. For example, obtaining a 3D nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum of a 20 kDa protein typically requires 5–10 mg of very pure and high cost isotopically-labeled protein. In x-ray crystallography, large amounts of very concentrated protein are required to test crystallization conditions. In addition, protein purity alone is not always sufficient to ensure successful crystal growth. Even small changes in a protein's three-dimensional structure can disturb crystal formation¹⁴⁻¹⁶. If an alternative conformation or oligomer attaches to the crystal, it may form a crystal surface that prevents attachment of other protein molecules, poisoning its growth^{17,18}. Proteins can exist as multiple conformations in equilibrium due to many factors, such as structural flexibility, enzymatic activity, cooperativity, and oligomerization. For some experiments, conformational purity may not be important. For example, a biological activity assay of a protein with 20% in an inactive conformation is equivalent to another experiment with 20% less protein, but with 100% in an active conforma-



tion. However, in crystallography, NMR, and many other types of studies, this information may be relevant and necessary. A simple technique that can compare and ensure that different protein samples, obtained from different purification protocols, have the same conformational distribution is helpful in such cases.

In this paper, we suggest the use of a simple and fast 1D ^1H NMR spectrum to validate refolding protocols before increasing protein production. This technique is able to detect very small conformational changes in protein structure, as ^1H NMR is sensitive to changes in the environment of each hydrogen atom of a molecule (see e.g.¹⁹). It represents a powerful method for the verification of the spatial structure of (macro)molecules²⁰ and gives us the expected information, and these properties are unique and essential for subsequent structural studies of the analyzed sample.

We applied the proposed method to P21 from *Trypanosoma cruzi*, an 18 kDa protein that contains six cysteine residues that are all expected to form disulfide bonds. P21 is a ubiquitous secreted protein of *T. cruzi*, the causative parasite of Chagas disease. P21 was found to serve as part of host cell invasion mechanism²¹, triggering actin polymerization on the host cell via interactions with the CXCR4 chemokine receptor²², which is present on the cellular membrane. Previous studies²¹ showed that recombinant P21 (P21-His₆, with an N-terminal histidine tag) adheres to HeLa cells in a dose-dependent manner. Additionally, invasion of HeLa cells by *T. cruzi* metacyclic trypomastigotes (tissue cultured trypomastigotes, TCT) and extracellular amastigotes (EA) is greatly increased in the presence of P21-His₆. Furthermore, P21-His₆ upregulates the phagocytosis of zymosan particles in mice peritoneal macrophages²², indicating that P21 is involved in the phagocytic mechanism. More than 95% of expressed P21-His₆ is insoluble in *Escherichia coli*, making the yield of the soluble protein insufficient for biological and structural studies. To overcome this limitation, we extracted P21-His₆ from inclusion bodies using urea and refolded it. Since recombinant P21 is fused to a histidine tag, we used nickel affinity chromatography to refold the protein by applying a slow urea gradient. This technique has been used successfully to refold proteins in many cases^{23–27} because protein absorption on the solid matrix prevents aggregation during the process through separation of individual protein molecules⁵. To assess the available refolding validation techniques, we compared parasite invasion and phagocytosis of particles induced by refolded (rP21-His₆) and soluble (sP21-His₆) protein. As a second approach, refolded and soluble protein structures were compared by circular dichroism (CD) to find information regarding the state of the proteins' secondary structures. Finally, 1D ^1H NMR spectra of the soluble and refolded proteins were compared in order to confirm the correct refolding of P21-His₆ at atomic resolution. Comparison of conformational identity between the soluble and refolded preparations is an essential analysis needed to perform structural studies using the refolded material, and NMR spectroscopy is the only one of these methods that addresses that question.

Results

The yield of P21-His₆ was greatly improved when the protein was recovered from inclusion bodies and refolded. In order to compare the yield of soluble to refolded protein, we expressed recombinant P21-His₆ in 8 L 2xYT medium. Expression produced 24.9 g of dry weight bacteria and 8.1 g of insoluble pellet after lysis and centrifugation. Most of the protein was present in the insoluble fraction. sP21-His₆ was purified from the soluble fraction in a single step of Nickel affinity chromatography; however, only 0.68 mg of purified protein was obtained. The refolding procedure recovered 57.76 mg of rP21-His₆ from inclusion bodies, a yield 85 times greater than purification from the soluble fraction.

Results from invasion and phagocytosis experiments demonstrated that soluble and refolded P21-His₆ have similar biological properties. In the presence of sP21-His₆, invasion of Vero cells by

TCT (Figure 1A) was increased approximately 3.6-fold, and invasion by EA (Figure 1B) was increased approximately 2.4-fold. Similar results were obtained for rP21-His₆ (4.4-fold increase for TCT and 2.3-fold increase for EA). The difference between sP21-His₆ and rP21-His₆ was not significant. Phagocytosis of zymosan particles by macrophages was increased 3.5-fold with the addition of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sP21-His₆ (Figure 1C) and 3.5-fold with the addition of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rP21-His₆²². The similarity of these increases suggests that refolded and soluble protein exhibit the same biological properties.

Finally, CD and NMR experiments validated the correct refolding of P21-His₆. The CD spectra showed equivalent secondary structure composition for both preparations (Figure 2B). Comparison between ^1H NMR spectra of sP21-His₆ and rP21-His₆ showed exactly the same chemical shifts and intensities for every proton in the structure (Figure 2C). In this way, both samples could be compared directly and were found to be identical to one another, with respect to both correct folding and conformational ensemble. To better evaluate the similarities (or differences) between the spectra of both samples, a difference spectrum was calculated and is shown in Figure 2C (green line). The larger differences can be assigned to non-protein components of the sample (residual ethanol from concentrator rinsing, small differences in DSS concentration, low molecular weight contaminants). These differences underscore the sensitivity of the method and the identity of both protein conformations and ensembles. In addition, up field shifts around 0 ppm in both spectra indicate a hydrophobic nucleus in P21-His₆, showing that the structure is folded.

Discussion

In this study, we applied a one-step refolding procedure to P21-His₆, which increased the yield of the protein 85-fold. This refolding method is based on immobilization of the P21-His₆ on Nickel-affinity resin, preventing protein aggregation during the process. Refolding requires approximately 14 hours (which can be performed overnight with no need for human interference) and uses less than 0.5 L of buffer. It is less laborious and quicker than other refolding techniques, such as dialysis.

We used pre-existing biological information about P21 to develop protein-specific assays that could be applied to both refolded and soluble P21-His₆ fractions. Both samples increased parasite invasion and phagocytosis of zymosan particles at similar rates, suggesting that they behaved identically with respect to biological activity. This information would be sufficient in a majority of biological studies, but is not sufficient for structural studies, in which correct folding and conformational homogeneity of samples are essential.

As more structure-focused approaches, CD and NMR spectra provided structural comparisons between sP21-His₆ and rP21-His₆. Although CD measurements provide information about protein secondary structure, no information at an atomic resolution can be provided. This method is more useful for identifying incorrectly folded proteins by detecting differences in the spectra, because even if two spectra are identical, we cannot confirm that structures are equal. Simple one-dimensional ^1H NMR overcomes this limitation by providing information about the environment of each ^1H atom of the protein, allowing a comparison of samples obtained by different purification methods at atomic resolution. With this simple 1D ^1H NMR measurement, we confirmed that sP21-His₆ and rP21-His₆ have exactly the same structures and identical conformational equilibria. In addition, more important information can be obtained from the spectrum: the good dispersion of the peaks over the ppm scale indicates the presence of secondary structure, and the existence of high-field shifted peaks around the reference (DSS at 0 ppm) indicates the presence of a hydrophobic core in the protein. Therefore, the structural and the biological data were in agreement, as expected.

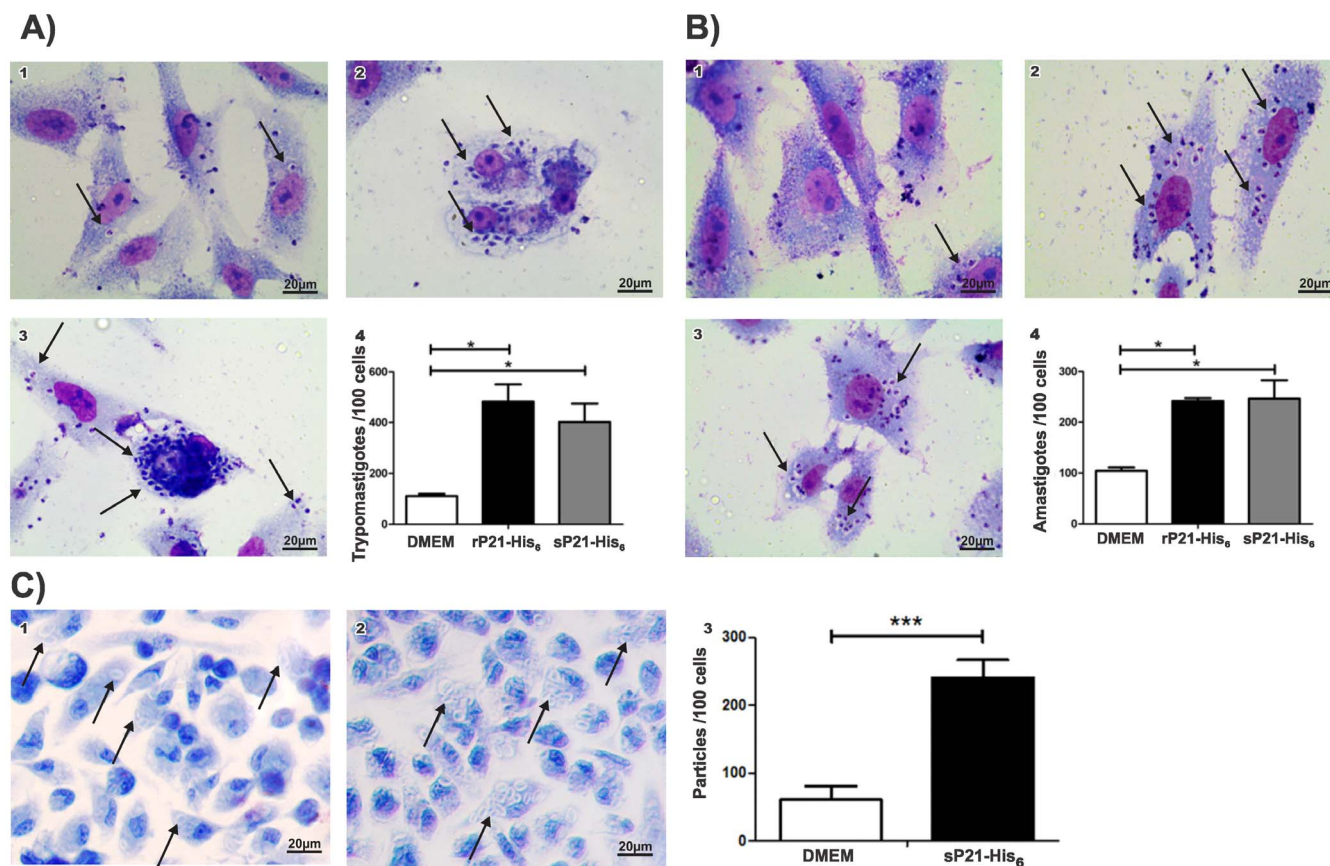


Figure 1 | (A) sP21-His₆ and rP21-His₆ affect invasion of Vero cells by *T. cruzi* TCT and EA. Light microscopy of (a) TCT invasion and (B) EA invasion after treatment with (1) DMEM (control, not treated), (2) 40 µg/mL of rP21-His₆ and (3) 40 µg/mL of sP21-His₆. (4) Quantification. Arrows in (1), (2), and (3) indicate internalized parasites. (C) Phagocytosis of zymosan particles by mice peritoneal macrophages in the presence of sP21-His₆. Light microscopy of (1) control (untreated) cells and (2) cells treated with 40 µg/mL sP21-His₆. (3) Quantification of (1) and (2). Arrows in (1) and (2) indicate internalized particles.

We propose the use of simple and fast 1D ¹H NMR spectra to validate refolding protocols before increasing protein production. This technique is able to detect very small conformational changes in protein structure, as ¹H NMR is sensitive to changes in the environment of each hydrogen atom of a molecule. By searching the REFOLD database²⁸, we found that 34 of 1001 refolded proteins used this NMR spectroscopy in some way. In the majority of cases, the studies were driven by NMR, and the refolded protein was produced and isotopically labeled for analysis. Only three proteins from the database used simple 1D ¹H NMR spectra, two of them for visual inspection^{29,30}, and one for comparison with the natural modified protein³¹. In a recent study³², the authors compared the 1D ¹H NMR spectra from the refolded protein and the protein purified from soluble fraction. They concluded that the structures were exactly the same because the spectra were identical (no spectral difference was presented). In a recent review³³ focused on tools used to evaluate protein conformations, NMR is briefly mentioned as one of the leading techniques of structural biology. The authors said that NMR “still requires very sophisticated equipment, appreciable amounts of sample, and specialist human resources that keep them away from the pipeline in protein production and control. Newer techniques (or new applications of well-established techniques) are being developed to complement these traditional biophysical assays and to provide information on the success of protein folding.” We want to stress that the proposed method uses the detailed information present in NMR spectra in a simple way, to answer a simple question. If NMR (as x-ray crystallography) is analyzed as a tool to determine three-dimensional protein structure, then it presents the

difficulties pointed out in the aforementioned review; however, this is not the case for the 1D ¹H spectra needed for conformational comparisons of two samples.

Conclusion

One-dimensional homonuclear ¹H NMR spectroscopy requires no special sample production and little time for measurement. Typically, a high quality spectrum of a 500 µL protein sample (~100 µM of a small protein) on a 600 MHz spectrometer can be obtained in less than 30 minutes. Most of the time is spent on adjustment of the equipment and definition of experimental parameters. Using spectrometers with a cryoprobe is desirable, but not required. Spectra processing and comparison is very quick and can be performed immediately after acquisition using spectrometer software.

Finally, simple precautions should be taken for the preparation of NMR samples. The NMR buffer should be of neutral to acidic pH and low ionic strength. High pH results in less protonated amides, causing loss of signal. Low salt concentration (up to 300 mM) is required to minimize radio wave reflections during NMR pulses that can cause heating of the sample (tuning and matching of the spectrometer probe head). ¹H NMR is very sensitive to non-water exchangeable hydrogens of small molecules, and, as a consequence, the use of hydrogen-containing buffer agents (like Tris, Acetate, MES, and HEPES) and some other molecules (glycerin, DTT, etc.) should be avoided, or these reagents can be replaced by their deuterated equivalents. Sodium or potassium phosphate buffer is recommended, since the hydrogen atoms of these compounds are exchangeable with water, resulting in a signal that is coincident with the water resonance

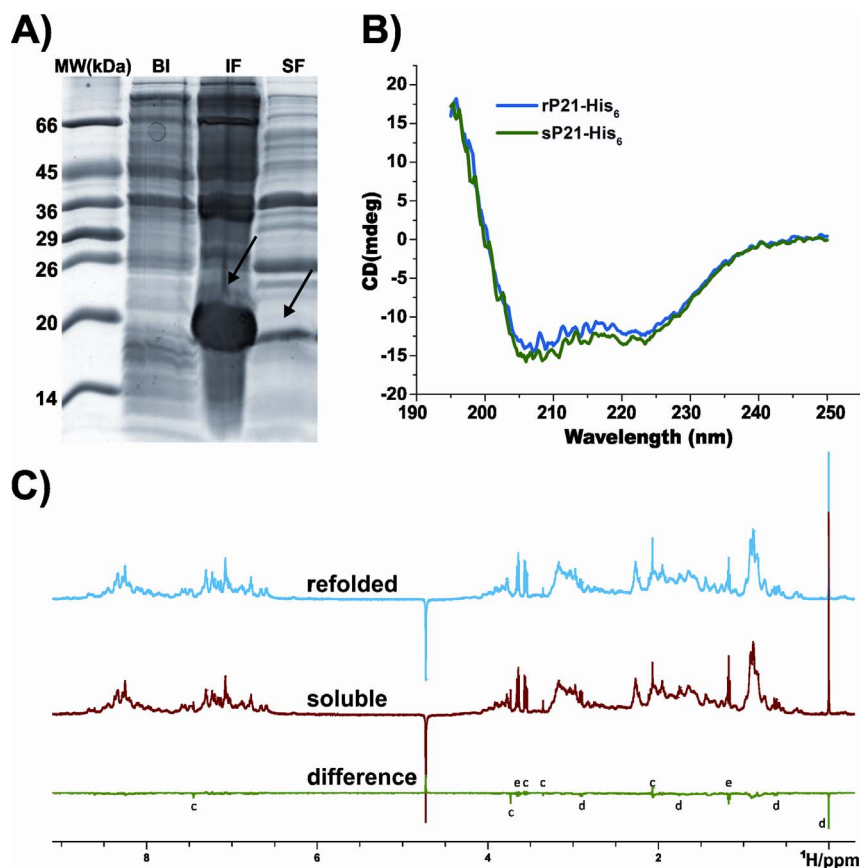


Figure 2 | (A) SDS-PAGE of bacterial lysate, showing the predominate expression of P21-His₆ in the insoluble fraction. Lanes: (MW) molecular weight markers, (BI) lysate before IPTG induction, (IF) insoluble fraction after induction, and (SF) soluble fraction after induction. Arrow indicates the position of P21-His₆. (B) Circular dichroism (CD) spectra of refolded and soluble P21-His₆. Superposition of rP21-His₆ (blue) and sP21-His₆ (green) CD spectra at 20°C. Refolded and soluble protein samples have similar secondary structure composition. (C) Comparison between 1D ¹H NMR spectra of sP21-His₆ and rP21-His₆, showing exactly the same structure for both proteins. Spectrum of refolded (blue) and soluble (red) protein; spectra difference after normalization (green). The marked peaks indicate (c) low weight contaminants, (d) DSS, and (e) residual ethanol.

that should be suppressed. Moreover, extensive care with contaminants should be taken, as ¹H NMR can detect contaminant signals, even in small concentrations.

Methods

Protein expression and cell lysis. P21-His₆ was expressed in *Escherichia coli* BL21 cells transformed with a pET-28a(+) (Novagen) expression vector, which contains an N-terminal His₆-tag followed by a thrombin recognition site. Expression was carried out in 8 L of 2xYT medium (16 g tryptone, 10 g yeast extract, 5 g NaCl per 1 L medium) containing 35 µg/mL kanamycin. Bacteria were incubated at 37°C until the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) reached ~0.7, at which point expression was induced by addition of 0.5 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Cultures were then incubated for an additional 3 hours at 37°C. Cells were harvested by centrifugation at 6,000 × g for 40 minutes at 4°C and resuspended in lysis buffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) containing 1 mg/mL lysozyme. The solution was maintained on ice for 30 min before cells were lysed by ultrasound (15 cycles of 40 s at 40 W, 40 s interval). The lysate solution was subjected to centrifugation (14,000 × g for 40 min at 4°C), and both supernatant and pellet were used for native and denaturing purification of the protein, respectively.

Native P21-His₆ purification from the soluble fraction (sP21-His₆). The soluble fraction was added to 2 mL of Ni-NTA resin (Qiagen) and extensively washed with lysis buffer. To remove low-affinity bound proteins, a second wash with wash buffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole, pH 8.0) was performed. sP21-His₆ was eluted with elution buffer I (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 160 mM imidazole, pH 8.0), concentrated, and dialyzed against buffer II (50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8.0).

Denaturing P21-His₆ purification and refolding from the insoluble fraction (rP21-His₆). In order to extract the expressed protein from inclusion bodies, the lysate pellet was resuspended in urea buffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 5 mM imidazole, 6 M urea, 5% (v/v) glycerol, pH 8.0) and stirred overnight at room temperature. After centrifugation (14,000 × g for 40 min at 4°C), the supernatant,

containing P21-His₆ extracted from the inclusion bodies, was immobilized in a column containing 5 mL Ni-NTA resin fixed on an Äkta Purifier system. After extensive washing with urea buffer, the urea concentration was slowly decreased with a linear buffer gradient (-7 mM/min of urea, 0.5 mL/min)²³. To remove glycerol and additional impurities, the column was washed with wash buffer until no protein signal was detected. rP21-His₆ was eluted with elution buffer II (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 220 mM imidazole, pH 8.0), concentrated, and dialyzed against buffer II (see above).

Cell lines and cultures. Vero cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Cultilab), 10 mg/mL streptomycin (Sigma), 100 U/mL penicillin (Sigma), and 40 mg/mL gentamicin (Sigma) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Peritoneal macrophages from BALB/C mice were harvested from the peritoneal cavity in 5 mL DMEM. Mice were stimulated with 1 mL 3% thioglycollate medium 3 days prior to harvest.

Parasites. To generate tissue-cultured trypomastigotes (TCT) from the CL strain, confluent monolayers of Vero cells were infected with metacyclic trypomastigotes and maintained for at least two weeks to establish the intracellular cycle. Extracellular amastigotes (EA) were derived from trypomastigotes by axenic differentiation. Infected Vero cell cultures were subjected to centrifugation (2500 × g, 5 minutes), and the pellet was resuspended in liver infusion tryptose (LIT) medium. Finally, the resuspension was incubated for 18 hours at 37°C to generate at least 95% pure extracellular amastigotes.

Animals and ethics. Male or female BALB/c mice were six to eight weeks old and were maintained under standard conditions on a 12 hour light, 12 hour dark cycle in a temperature controlled room (25 ± 2°C) with food and water *ad libitum*. All experimental protocols were approved by the Ethics Committee from Universidade Federal de Uberlândia. Moreover, maintenance and care of these animals complied with the guidelines of the Laboratory Animal Ethics Committee from the Institution. Animal euthanasia was performed in accordance with international welfare grounds,



according to the American Veterinary Medical Association Guidelines on Euthanasia.

Host cell invasion assay. A volume of 500 μL Vero cell suspension (1.5×10^5 cells) was added to multiwell plates containing sterile glass coverslips and incubated overnight. The invasion assay was performed by adding EA (20 parasites per cell) or TCT (10 parasites per cell) to plates in the presence or absence of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sP21-His₆ or 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rP21-His₆. The plates were incubated for 2 hours at 37°C in a humidified incubator containing 5% CO₂. After incubation, the cells were gently washed three times with PBS, fixed with Bouin's solution, and stained with Giemsa.

Phagocytosis assay. Zymosan particles (10 mg/mL, Sigma) were resuspended in sterile PBS, sonicated for 15 minutes, and pelleted by centrifugation. To determine particle concentration, a Neubauer chamber was used for counting. Resident peritoneal macrophages were seeded in cell culture well plates (5×10^5 cells/well) containing 13 mm round glass coverslips and were then incubated overnight in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C to allow the cells to adhere. Non-adherent cells were removed by washing with PBS before adding DMEM containing 10% FBS. To perform the phagocytosis assay, zymosan particles were added to wells (20 particles/each macrophage fixed) in the presence or absence of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sP21-His₆. Particles were incubated with macrophages for 2 hours. The cells were then washed with PBS, fixed in Bouin's solution, and stained with Giemsa. Results were expressed as the number of internalized particles/100 cells. These results were compared to those previously determined for rP21-His₆ using the same protocol²².

Circular dichroism spectropolarimetry (CD). Spectra were recorded on a Jasco 815 CD spectrometer using 0.1 cm thick quartz cells. Samples containing 0.15 mg/mL sP21-His₆ or rP21-His₆ in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) were analyzed at 20°C to assess structural similarity.

Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). Samples of sP21-His₆ and rP21-His₆ were concentrated to the same concentration (1.3 mg/mL, 70 μM in a final volume of 500 μL) and then simultaneously dialyzed against 2 L NMR buffer (50 mM potassium phosphate, 150 mM KCl, pH 6.0) at 4°C. The NMR buffer was changed twice to ensure that the samples were in exactly the same buffer conditions for NMR measurements, as ¹H signals are very sensitive to changes in their environment. DSS (100 μM , for spectrum referencing) and D₂O (5% v/v), for tuning and matching the spectrometer probe head) were added to both samples. 1D ¹H spectra were recorded at 303 K in a high-resolution, small bore 600 MHz Bruker Avance III spectrometer. Since the spectrometer was equipped with a TCI cryoprobe, a 4 \times enhancement in the signal intensity was achieved. The intense water signal around 4.8 ppm, typical for an aqueous protein sample, was suppressed using a standard watergate W5 pulse sequence. To ensure spectra with a good signal to noise ratio were obtained for the diluted samples, each 1D experiment was acquired with a total of 256 scans, resulting in an experimental time of approximately 17 minutes per spectrum. Proton chemical shifts were referenced (0 ppm) to the ¹H resonance frequency of the sharp and intense signal of the methyl groups in DSS. Time-domain data were acquired and processed with an exponential line broadening of 1 Hz using the Bruker BioSpin spectrometer control software TopSpin 3.1. The same software was used for the spectra analysis and for obtaining the difference spectrum.

- Juergen, B. *et al.* Quality control of inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* **9**, (2010).
- Christendat, D. *et al.* Structural proteomics of an archaeon. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 903–909 (2000).
- Service, R. F. Structural genomics - Tapping DNA for structures produces a trickle. *Science* **298**, 948–950 (2002).
- Singh, S. M. & Panda, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* **99**, 303–310 (2005).
- Eiberle, M. K. & Jungbauer, A. Technical refolding of proteins: Do we have freedom to operate? *Biotech. J.* **5**, 547–559 (2010).
- Yamaguchi, S., Yamamoto, E., Mannen, T. & Nagamune, T. Protein refolding using chemical refolding additives. *Biotech. J.* **8**, (2013).
- Belorgey, D., Crowther, D. C., Mahadeva, R. & Lomas, D. A. Mutant neuroserpin (S49P) that causes familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies is a poor proteinase inhibitor and readily forms polymers *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **277**, 17367–17373 (2002).
- Ward, R. J. *et al.* Refolding and purification of bothropstoxin-1, a Lys49 - Phospholipase A(2) homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif.* **21**, 134–140 (2001).
- Nishiyama, Y. *et al.* Refolding from denatured inclusion bodies, purification to homogeneity and simplified assay of MGDG synthases from land plants. *Protein Expression Purif.* **31**, 79–87 (2003).
- Sharma, S. K., Goloubinoff, P. & Christen, P. Heavy metal ions are potent inhibitors of protein folding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **372**, 341–345 (2008).
- Li, D. W. *et al.* Refolding and characterization of recombinant human GST-PD-1 fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **36**, 141–146 (2004).

- Jang, S. H., Kang, D. K., Chang, S. I., Scheraga, H. A. & Shin, H. C. High level production of bovine angiogenin in *E-coli* by an efficient refolding procedure. *Biotechnol Lett.* **26**, 1501–1504 (2004).
- Gustafsson, E. *et al.* Purification of truncated and mutated Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus*-an anti-inflammatory protein. *Protein Express. Purif.* **63**, 95–101 (2009).
- Rosenberger, F. Protein crystallization. *J. Cryst. Growth* **166**, 40–54 (1996).
- Rosenberger, F., Vekilov, P. G., Muschol, M. & Thomas, B. R. Nucleation and crystallization of globular proteins - What we know and what is missing. *J. Cryst. Growth* **168**, 1–27 (1996).
- Lorber, B., Skouri, M., Munch, J. P. & Giege, R. The influence of impurities on protein crystallization: the case of lysozyme. *J. Cryst. Growth* **128**, 1203–1211 (1993).
- Heijna, M. C. R., van Enckevort, W. J. P. & Vlieg, E. Growth inhibition of protein crystals: A study of lysozyme polymorphs. *Cryst. Growth Des.* **8**, 270–274 (2008).
- McPherson, A., Malkin, A. J., Kuznetsov, Y. G. & Koszelak, S. Incorporation of impurities into macromolecular crystals. *J. Cryst. Growth* **168**, 74–92 (1996).
- Wüthrich, K. in *NMR of Proteins and Nucleic Acids* (John Wiley & Sons, New York, 1986).
- Kalbitzer, H. R. Method for verifying the correct spatial structure of molecules by means of NMR spectroscopy. US Patent 20060155480 filed 11 jan. 2005, and issued 13 Jul. 2006.
- da Silva, C. V. *et al.* Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. *Microb. Infect.* **11**, 563–570 (2009).
- Rodrigues, A. A. *et al.* A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis. *PLoS ONE* **7**, e51384 (2012).
- Lemercier, G., Bakalara, N. & Santarelli, X. On-column refolding of an insoluble histidine tag recombinant exopolyphosphatase from *Trypanosoma brucei* overexpressed in *Escherichia coli*. *J. Chromatogr. B* **786**, 305–309 (2003).
- Glynou, K., Ioannou, P. C. & Christopoulos, T. K. One-step purification and refolding of recombinant photoprotein aequorin by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Protein Express. Purif.* **27**, 384–390 (2003).
- Barb, A. W., Wang, X. & Prestegard, J. H. Refolded recombinant Siglec5 for NMR investigation of complex carbohydrate binding. *Protein Express. Purif.* **88**, 183–189 (2013).
- Dong, X.-Y., Chen, L.-J. & Sun, Y. Refolding and purification of histidine-tagged protein by artificial chaperone-assisted metal affinity chromatography. *J. Chromatogr. A* **1216**, 5207–5213 (2009).
- Hutchinson, M. H. & Chase, H. A. Adsorptive refolding of histidine-tagged glutathione S-transferase using metal affinity chromatography. *J. Chromatogr. A* **1128**, 125–132 (2006).
- Chow, M. K. M. *et al.* The REFOLD database: a tool for the optimization of protein expression and refolding. *Nucleic Acids Res.* **34**, D207–D212 (2006).
- Tanaka, T. *et al.* Characteristics of a de-novo designed protein. *Protein Sci.* **3**, 419–427 (1994).
- Hrzenjak, A., Frank, S., Maderegger, B., Sterk, H. & Kostner, G. M. Apo(a)-kringle IV-type 6: expression in *Escherichia coli*, purification and *in vitro* refolding. *Protein Eng.* **13**, 661–666 (2000).
- Assadi-Porter, F. M., Aceti, D. J., Cheng, H. & Markley, J. L. Efficient production of recombinant brazzein, a small, heat-stable, sweet-tasting protein of plant origin. *Arch. Biochem. Biophys.* **376**, 252–258 (2000).
- Ogura, K. *et al.* Practical applications of hydrostatic pressure to refold proteins from inclusion bodies for NMR structural studies. *Protein Eng. Des. Sel.* **26**, 409–416 (2013).
- Manta, B., Obal, G., Ricciardi, A., Pritsch, O. & Denicola, A. Tools to evaluate the conformation of protein products. *Biotech. J.* **6**, 731–741 (2011).

Acknowledgments

This study was supported by grants and fellowships from FAPEMIG, CAPES, FAPESP (grants 2010/51867-6, 2012/21153-7), CNPq and INBQMeDI. CVS was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - Processes numbers: APQ-00621-11, APQ-00305-12); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Process number: 23038.005295/2011-40).

Author contributions

M.A.S. performed re-folding purification, the biological experiments, acquired, analyzed and interpreted the data and drafted the manuscript; F.B.T. performed in-column re-folding purification and NMR experiments, acquired, analyzed and interpreted the data and drafted the manuscript; H.H.T.M. performed soluble fraction purification, CD and biological experiments, acquired, analyzed and interpreted the data and drafted the manuscript; A.A.R., F.C.M., T.M.C., P.C.B., R.T.S., C.P. & R.G.B.G. performed biological experiments; D.B. & R.A.M. critically revised the manuscript and contributed to its intellectual content; C.E.M. designed the in-column refolding purification and NMR experiments, drafted the manuscript and critically revised the manuscript and contributed to its intellectual content; C.V.S. designed the biological experiments, drafted the manuscript and critically revised the manuscript and contributed to its intellectual content; E.H. designed soluble fraction purification and CD experiments, drafted the manuscript and critically revised the manuscript and contributed to its intellectual content. All the authors approved the final version to be submitted.



Additional information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Santos, M.A.d. *et al.* A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. *Sci. Rep.* **4**, 4259; DOI:10.1038/srep04259 (2014).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported license. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0>