

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

**Papel do fator de troca de nucleotídeos guanina RasGEF1b na resposta  
imune ao protozoário parasito *Trypanosoma cruzi***

HELIANA DE BARROS FERNANDES

BELO HORIZONTE

Abril de 2018

HELIANA DE BARROS FERNANDES

**Papel do fator de troca de nucleotídeos guanina RasGEF1b na resposta imune ao protozoário parasito *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título em Doutora em Biologia Celular.

**Orientador:**  
Prof. Dr. Aristóbolo Mendes da Silva

BELO HORIZONTE

Abril de 2018

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus. Pela força e conforto pra alma.

Ao meu Orientador, Prof. Dr Aristóbolo Mendes da Silva. Só tenho a lhe agradecer por tudo: pela orientação no dia-a-dia, pelas vezes que foi para bancada me ensinar passo-a-passo boa parte das técnicas de biologia molecular que sei hoje, pelos ensinamentos e momentos de discussão científica. Admiro você como cientista, pela sua ética e compromisso com o conhecimento gerado em suas pesquisas; admiro-lhe também como pessoa, pela gentileza e compreensão por todas as vezes que precisei me ausentar ou ir pra casa (no Piauí). Muito obrigada pela confiança e por contribuir de maneira inestimável para minha formação!

Aos membros da banca: Dr. Helton Santiago; Dr. Marco Campos; Dra. Rosiane Pereira e Dra. Ludmila Ferreira; por aceitarem o convite e se disporem a ler meu trabalho. As críticas e sugestões serão muito bem-vindas. Agradeço também aos suplentes Dr. André Talvani e Dra. Luciana Andrade, por aceitarem o convite.

Agradeço à Pós-graduação em Biologia Celular: aos professores pelos ensinamentos; à Rhuanna, pela atenção e gentileza em tirar as dúvidas na secretaria; pela oportunidade de participar da organização de um evento científico que, sem dúvidas, foi uma ótima experiência.

Sou grata ainda à todos aqueles que contribuíram mais incisivamente pela minha formação profissional nesses quatro anos:

- Professora Luciana Andrade: meu obrigada vai muito além da concessão do espaço para que eu pudesse realizar meus experimentos de infecção *in vitro*: por todas as vezes que precisei discutir um resultado ou tirar uma dúvida; seu laboratório sempre considerei um pouco o meu, afinal me sentia a vontade para trabalhar, além das amizades que fiz e que muito considero: Natália, Patrícia, Luíza, Rhyanne, Anny, Wesley e mais recentemente o Jorge. A todos vocês que compõem o LBCM, obrigada pelos momentos de descontração, pela receptividade e respeito.

- Professora Fabiana Machado: agradeço imensamente pelas portas abertas e, sem dúvidas, pelas contribuições científicas. Do LIDIN também sou grata pela amizade e parceria mais que especial da Andréia, que com sua expertise me ensinou a trabalhar com *T. cruzi in vivo*, que várias vezes quebrou cabeça junto comigo para resolver os percalços que surgiam, além da leveza nos momentos de trabalho e da amizade fora do

laboratório. Obrigada também ao Diego e Alysson, que depois que a Andréia foi para o sanduíche, foram quem me deram apoio.

- Professora Sílvia Guatimosim: pela parceria na geração da linhagem de camundongos nocautes condicionais cardíacos.

- Professora Rosa Arantes: obrigada pela disponibilidade e pelo auxílio com as análises histopatológicas. Agradeço também à Mayra, que me ajudou diretamente com as análises, pela paciência e amizade.

- Professor Ricardo Gazzinelli: pela estrutura cedida no Centro de Pesquisas René Rachou para a realização dos primeiros experimentos. À Dra. Caroline Junqueira e Policarpo Sales Júnior, pela ajuda inicial.

- Agradeço aos professores que gentilmente permitiram o uso de alguns equipamentos ou compartilharam espaços: Rodolfo Guentuchi, pelo biotério; Flávio Fonseca, pelo transluminador UV.

Não poderia deixar de agradecer à todos os membros e ex-membros do LGI: Brener, Felipe, Jôsy, Fernanda, Isadora, Igor, Grazielle, Mariana, Kathleen e Rhaylla. Tenho um carinho muito especial por cada um de vocês. Agradeço por terem feito o meu local de trabalho o lugar aonde eu queria estar desde que planejei vir para BH. Não conto nos dedos tudo que aprendi com vocês, de ciência e convivência. Admiro todos vocês pela competência, humildade e capacidade de trabalho. O clima de trabalho sempre leve, concentrado maior parte do tempo e descontraído quando tinha que ser. A amizade que construí com alguns de vocês levarei por toda a vida.

E claro, agradeço ao meu melhor amigo, meu confidente, companheiro e namorado, Brener. A nossa relação sempre foi especial, antes mesmo de sermos tão íntimos. Obrigada por cuidar de mim, por me ouvir e me aguentar nos momentos de estresse e TPM, por acreditar no meu potencial, por todo carinho e amor que sinto emanar de você a todo instante. Eu amo você! Obrigada também por me “emprestar” sua família. Obrigada Dona Beth e a Thâmara, por me acolherem tão docemente, pelos almoços de final de semana e pelo carinho.

A trajetória foi grande e muitas pessoas foram (e ainda são) essenciais para mim: Marliete, a quem devo em partes ter vindo para cá, foi quem me incentivou e me deu apoio desde quando cheguei até hoje. E na verdade estamos juntas desde da graduação e hoje realizamos um sonho que sempre planejamos. Marli, tu é uma irmã que a vida me deu, um anjo da guarda e porto seguro. Te amo, nega! Junto a você viforam outras boas amizades: Gabriela, Juliana, Rodrigo e Gustavo. Sem contar com a ótima convivência

com todos da Micologia. E, claro, aos amigos que compartilhamos: Lanna, Luciana, Guilherme, Mirela, José Ricardo, André, Radarane, Matias, Verônica. Todos vocês tornaram esses anos mais felizes!

Á Evelin e Gisele, amigas com quem posso sempre contar. Vivemos um tempo maravilhoso juntas e agora cada uma está tomando seu rumo, mas mesmo longe ainda estamos juntas. Agradeço também ao Thiago, meu primo/irmão. Dividimos muito mais do que as despesas nesses quase quatro anos: amizade e companheirismo de toda vida e pra vida toda.

E não é a distância que vai diminuir a importância das pessoas. A todos os meus amigos que não puderam conviver comigo nesse tempo, mas que sempre me deram força: Mariana, Milena, Jurandir, Marcela, Lorena, Dênio, Fernanda, Luana, Erlane, Márcia e Alyne.

E por fim, e jamais menos importante, agradeço imensamente à minha família, meus pais Borges e Teresinha e meus irmãos Humberto, Henrique, Hélio e Júnior. Vocês são minha fortaleza! Obrigada pelo apoio incondicional e pela compreensão da minha ausência. Cada conquista minha tem o toque de todos vocês. Mesmo estando longe, estamos sempre em sintonia. Minhas cunhadas: Marina, Elza, Caroline e Ângela, pelas pessoas que são e por serem as companheiras de meus irmãos. Em especial à Elza, minha “cumade” que tenho como uma irmã, pelo apoio e carinho. Meus sobrinhos Arthur e Ana Maria (afilhada), por existirem. A tia sofre muito por não vê-los crescer. Amo muito todos vocês!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XII
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVII
<b>1 Fundamentação teórica.....</b>	<b>1</b>
1.1 Doença de Chagas: distribuição, etiologia e tratamento.....	1
1.2 Aspectos gerais da resposta imune na Doença de Chagas.....	3
1.3 Miocardite na doença de Chagas e o envolvimento dos cardiomiócitos.....	6
1.4 Proteínas Ras no contexto da resposta imune.....	7
1.5 O fator de troca de guanina RasGEF1b.....	9
1.6 Camundongos nocautes e o sistema Cre/loxP.....	10
<b>2. Justificativa e hipótese.....</b>	<b>13</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>14</b>
3.1 Objetivos específicos.....	14
<b>4. Material e Métodos.....</b>	<b>15</b>
4.1 Animais.....	15
4.2 Genotipagem dos camundongos.....	15
4.2.1 Obtenção de DNA genômico.....	15
4.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	16
4.3 Teste de contaminação por <i>Mycoplasma</i> sp. ....	16
4.4 Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea.....	16
4.4.1 Citometria de fluxo.....	17
4.5 Manutenção <i>in vitro</i> de <i>T. cruzi</i> .....	18
4.6 Infecção de BMDMs com <i>T. cruzi</i> .....	18
4.7 Dosagem de óxido nítrico.....	19
4.8 Infecção <i>in vivo</i> com <i>T. cruzi</i> .....	19
4.8.1 Parasitemia e mortalidade.....	19
4.8.2 Obtenção de soro e tecidos.....	19
4.9 Extração de RNA total.....	20
4.10 Síntese da 1ª fita de cDNA.....	20
4.11 Análises de expressão gênica por RT-qPCR.....	21
4.12 Cultura de esplenócitos.....	21
4.13 Obtenção e cultivo de células não-parenquimais do fígado.....	22

4.14 Dosagem de citocinas .....	23
4.15 Dosagem de transaminases hepáticas (TGO e TGP) .....	23
4.16 Histopatologia.....	23
4.17 Parasitismo tecidual .....	24
4.18 Geração de camundongos com deleção gênica condicional de <i>Rasgef1b</i> em cardiomiócitos.....	25
4.19 Isolamento de cardiomiócitos murinos e RT-qPCR.....	25
4.20 Oligonucleotídeos .....	27
4.21 Análises estatísticas .....	30
<b>5. Resultados .....</b>	<b>31</b>
5.1 RasGEF1b é dispensável para a internalização, multiplicação e liberação de <i>T. cruzi</i> em macrófagos.....	31
5.2 BMBMs deficientes de RasGEF1b infectados com <i>T. cruzi</i> produzem mais Il-6 .....	36
5.3 A expressão de RasGEF1b é induzida no coração e fígado, mas não no baço de camundongos C57BL/6 infectados com <i>T. cruzi</i> .....	37
5.4 Sobrevida e parasitemia em camundongos deficientes de RasGEF1b .....	38
5.5 A concentração de IFN- $\gamma$ e IL-6 encontra-se elevada no soro de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO infectados com <i>T. cruzi</i> .....	42
5.6 Elevada produção de Ifn- $\gamma$ por esplenócitos de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO infectados com <i>T. cruzi</i> .....	46
5.7 Os níveis de mRNA de genes induzidos por Ifn- $\gamma$ encontram-se elevados no fígado de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO durante a infecção por <i>T. cruzi</i> .....	48
5.8 Elevada produção de IFN- $\gamma$ e nitrito por células não-parenquimais do fígado provenientes de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO infectados com <i>T. cruzi</i> .....	50
5.9 Fígado de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO apresentam alterações histopatológicas distintas dos camundongos WT durante a infecção com <i>T. cruzi</i> .....	51
5.10 Coração de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO tem maior inflamação tecidual durante a infecção por <i>T. cruzi</i> .....	54
5.11 Parasitismo tecidual no coração e fígado de animais RasGEF1b(Hc)-KO .....	56
5.12 A lesão hepática em camundongos RasGEF1b(Hc)-KO é similar à de camundongos WT durante a infecção com <i>T. cruzi</i> .....	57
5.13 Geração de camundongos com deleção condicional de RasGEF1b em cardiomiócitos .....	58
5.14 Rasgef1b é o membro da família RasGEF1b mais abundante no coração e em cardiomiócitos .....	62

<b>5.15 A deficiência de RasGEF1b em cardiomiócitos resulta em início tardio da parasitemia sem afetar a sobrevivência dos animais infectados .....</b>	<b>63</b>
<b>6. Discussão .....</b>	<b>64</b>
<b>7. Conclusões .....</b>	<b>73</b>
<b>8. Referências bibliográficas.....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição global dos indivíduos infectados por <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	2
Figura 2. Principais receptores da resposta imune inata reconhecedores de PAMPs do <i>T. cruzi</i> . .....	4
Figura 3. Esquema geral de regulação de uma Ras-GTPase.....	8
Figura 4. Esquema de cruzamentos para geração de camundongos nocautes condicionais de RasGEF1b em cardiomiócitos. ....	25
Figura 5. Esquema da localização dos primers utilizados na genotipagem dos camundongos RasGEF1b-KO. ....	28
Figura 6. Análise dos níveis de mRNA de Rasgef1b em BMDMs selvagens e nocautes de RasGEF1b. ....	31
Figura 7. Expressão de moléculas de superfície F4/80 e CD11b em macrófagos derivados de medula óssea. ....	32
Figura 8. Detecção de <i>Mycoplasma</i> sp. por PCR. ....	33
Figura 9. Taxa de infecção, multiplicação intracelular, liberação de tripomastigotas e produção de NO por BMDMs WT e RasGEF1b-KO durante a infecção por <i>T. cruzi</i> . ....	35
Figura 10. Análise da concentração de Il-6 no sobrenadante de cultura de BMDMs infectados com <i>T. cruzi</i> . ....	36
Figura 11. Análise dos níveis do mRNA de RasGEF1b no baço, coração e fígado de camundongos C57BL/6 após infecção com <i>T. cruzi</i> . ....	38
Figura 12. Genotipagem dos camundongos RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO por PCR e análise dos níveis de mRNA no baço. ....	39
Figura 13. Análise da sobrevivência e parasitemia em camundongos RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO infectados com <i>T. cruzi</i> . ....	41
Figura 14. Produção de citocinas no soro de camundongos C57BL/6, RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO infectados com <i>T. cruzi</i> . ....	44
Figura 15. Análise da concentração de Ifn- $\gamma$ e Il-6 no soro de camundongos WT, <i>Rasgef1b<sup>fl/fl</sup></i> , RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO infectados com <i>T. cruzi</i> . ....	46
Figura 16. Análise da concentração de Ifn- $\gamma$ e Il-6 no sobrenadante de cultura de esplenócitos provenientes de camundongos WT, RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO infectados com <i>T. cruzi</i> . ....	48

<b>Figura 17. Níveis de mRNA de genes induzidos por Ifn-<math>\gamma</math> no fígado de camundongos WT e RasGEF1b(Hc)-KO infectados <i>T. cruzi</i>.</b> .....	<b>49</b>
<b>Figura 18. Quantificação de Ifn-<math>\gamma</math> e NO em sobrenadante de cultura de LNPC's.</b>	<b>51</b>
<b>Figura 19. Histopatologia do fígado de animais WT e RasGEF1b(Hc)-KO infectados com <i>T. cruzi</i>.</b> .....	<b>53</b>
<b>Figura 20. Quantificação do infiltrado inflamatório no fígado.</b> .....	<b>54</b>
<b>Figura 21. Análises histopatológicas de coração de animais WT e RasGEF1b(Hc)-KO durante fase aguda da infecção por <i>T. cruzi</i>.</b> .....	<b>55</b>
<b>Figura 22. Parasitismo tecidual no fígado e coração de animais WT e RasGEF1b(Hc)-KO infectados com <i>T. cruzi</i>.</b> .....	<b>56</b>
<b>Figura 23. Análise de dano hepático em animais WT e RasGEF1b(Hc)-KO infectados com <i>T. cruzi</i>.</b> .....	<b>57</b>
<b>Figura 24. Abundância relativa de mRNA de <i>Rasgef1b</i> no coração e em cardiomiócitos</b> .....	<b>58</b>
<b>Figura 25. Genotipagem por PCR de DNA genômico do primeiro cruzamento de camundongos <i>Rasgef1b<sup>fl/fl</sup></i> e <i>Myh6-Cre<sup>+/-</sup></i>.</b> .....	<b>60</b>
<b>Figura 26. Genotipagem de camundongos RasGEF1b(Cm)-KO por PCR de DNA genômico e análise dos níveis de mRNA no coração.</b> .....	<b>61</b>
<b>Figura 27. Análise dos níveis do mRNA de membros da família RasGEF1 no coração camundongos WT e RasGEF1b(Cm)-KO.</b> .....	<b>62</b>
<b>Figura 28. Análise de sobrevida e parasitemia de camundongos RasGEF1b(Cm)-KO infectados com <i>T. cruzi</i>.</b> .....	<b>64</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para genotipagem, teste de <i>Mycoplasma</i> e RT-qPCR para parasitismo tecidual.....</b>	<b>27</b>
<b>Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados nas análises de RT-qPCR.....</b>	<b>29</b>

## ABREVIATURAS

ACK	<i>Ammonium-Chloride-Potassium buffer</i>
API	<i>Activator Protein 1</i>
BMDMs	<i>Bone Marrow Derived Macrophages</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
Ccl2	<i>Chemokine (C-C motif) Ligand 2</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
CMV	Promotor de Citomegalovírus
CpG-ODN	<i>CpG oligodeoxynucleotides</i>
Cxcl1	<i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1</i>
DC's	<i>Dendritic Cells</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dNTPs	<i>Deoxynucleotides</i>
DPI	Dia Pós-Infecção
DP	Desvio Padrão
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	<i>Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPM	Erro padrão da média
ET-1	<i>Endotelin 1</i>
<i>fl</i>	<i>Floxed</i>
GAP	<i>GTPase-Activating Protein</i>
GEF	<i>Guanine Exchange Factor</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
Ifn- $\gamma$	<i>Interferon-<math>\gamma</math> cytokine</i>
Il-10	<i>Interleukin-10 cytokine</i>
Il-12	<i>Interleukin-12 cytokine</i>
Il-18	<i>Interleukin-18 cytokine</i>
LLC-MK2	<i>Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells</i>
LNPC	<i>Liver Non-Parenchymal Cells</i>
LPS	Lipopolysaccharides

MAL/TIRAP	<i>MyD88-Adaptor-Like protein/Toll-Interleukin-1 Receptor Adapter Protein</i>
MAPKs	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
M-CSF	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
M-MLV RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation primary response gene 88</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NK	<i>Natural Killer cell</i>
NLRs	<i>NOD-like receptors</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCI	<i>Phenol: chloroform : isoamyl alcohol</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
RasGEF	<i>Ras associated GEF</i>
RasGRP	<i>RAS Guanyl-Releasing Protein</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute culture medium</i>
qPCR	<i>Quantitative real time PCR</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SFB	<i>Soro Fetal Bovino</i>
Sp-1	<i>Specificity protein 1</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
Tgf- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TGO	<i>Transaminase Glutâmica Oxalacética</i>
TGP	<i>Transaminase Glutâmica Pirúvica</i>
tGPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins from Trypanosoma cruzi trypomastigotes</i>
TLRs	<i>Toll-Like Receptos</i>
Tnf	<i>Tumor necrosis factor cytokine</i>
TRAM	<i>TRIF-Related Adaptor Molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN-<math>\beta</math></i>

UV	Ultravioleta
Vav-i	<i>Improved Vav-1 promoter</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## RESUMO

O *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas, ativa receptores presentes em células da imunidade inata, tais como receptores do tipo Toll. A sinalização disparada em células, como macrófagos e cardiomiócitos, leva à ativação de genes e à produção de importantes mediadores inflamatórios. Além de fatores secretados, tais como citocinas e quimiocinas, as proteínas intracelulares podem ter um papel crítico durante o controle da infecção por *T. cruzi*. RasGEF1b é um fator de troca de nucleotídeos guanina cuja expressão é induzida em macrófagos tratados com tGPI-mucina e *in vivo*, em tecidos como o coração e fígado de camundongos infectados com *T. cruzi*. No entanto, o papel do RasGEF1b durante a infecção por este parasito ainda não foi investigado. Neste trabalho foram utilizados camundongos nocautes completos (RasGEF1b-KO) ou com deleção condicional de *Rasgef1b* em células hematopoiéticas [RasGEF1b(Hc)-KO] para investigar o papel desta molécula na resposta imune inata ao *T. cruzi*. Análises *in vitro* foram realizadas em macrófagos derivados de medula óssea provenientes de camundongos selvagens e nocautes. Nas células infectadas não foram observadas diferenças nos eventos de internalização, multiplicação intracelular e de liberação do parasito. Em modelo de infecção *in vivo*, a deficiência de RasGEF1b não impactou no controle de parasitos no sangue e na sobrevivência dos animais. No entanto, em animais RasGEF1b(Hc)-KO a concentração sérica de Ifn- $\gamma$  e Il-6 foi significativamente mais elevada no 15º dia pós-infecção. Interessantemente, a produção de Ifn- $\gamma$  por esplenócitos ou por células não-parenquimais do fígado também foi elevada. Análises histopatológicas revelaram que a inflamação no fígado e no coração de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO é maior quando comparado com WT. Esta maior inflamação, no entanto, não impactou significativamente na carga parasitária destes animais. Apesar da resposta induzida por Ifn- $\gamma$  aumentada, não foi detectado dano hepático nos animais RasGEF1b(Hc)-KO. Em conjunto, esses resultados revelaram que o RasGEF1b não é essencial para o controle sistêmico do parasito durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, mas pode atuar como um regulador negativo de Ifn- $\gamma$  e Il-6 de uma maneira célula-específica. Considerando que a miocardite é uma das principais causas de morbidade entre pacientes chagásicos, nós geramos camundongos nocautes condicionais de RasGEF1b em cardiomiócitos [RasGEF1b(Cm)-KO]. Demonstramos que RasGEF1b é o membro mais expresso da família RasGEF1 no coração e em cardiomiócitos. Durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, os animais RasGEF1b(Cm)-KO sobrevivem, porém apresentam um atraso no pico de parasitemia.

Nossos dados forneceram evidências para o papel de RasGEF1b durante a fase aguda da doença de Chagas.

## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, activates receptors present on cells of innate immunity, such as Toll-like receptors. Intracellular signaling triggered in cells such as macrophages and cardiomyocytes leads to the activation of genes and consequent production of critical inflammatory mediators during infection. In addition to these secreted factors, such cytokines and chemokines, intracellular signaling proteins may play a role during the host control of *T. cruzi* infection. RasGEF1b is a guanine nucleotide exchange factor whose expression is induced in macrophages treated with tGPI-mucin and *in vivo* in tissues as the heart and liver of mice infected with *T. cruzi*. However, the role of RasGEF1b during the infection by this parasite still unknown. In this work, complete knockout mice (RasGEF1b-KO) or with conditional deletion of *Rasgef1b* in hematopoietic cells [RasGEF1b(Hc)-KO] were used to investigate the role of this molecule in the innate immune response to *T. cruzi*. *In vitro* analyzes were performed on bone marrow derived macrophages from wild type and and knockout mice. In infected cells no differences were observed in the events of internalization, intracellular multiplication and parasite release. In an *in vivo* infection model, RasGEF1b deficiency did not affect the control of parasites in the blood and survival of the animals. However, in RasGEF1b(Hc)-KO mice the serum concentration of Ifn- $\gamma$  and Il-6 was significantly higher at 15th day post-infection. Interestingly, the production of Ifn- $\gamma$  by splenocytes or liver non-parenchymal cells was also elevated in the RasGEF1b (Hc)-KO mice. Histopathological analyzes revealed that inflammation in the liver and heart of RasGEF1b(Hc)-KO mice is higher when compared to WT. However, this enhanced inflammatory infiltrate did not implicate an improvement in the control of tissue parasite load. Despite the increased concentration of Ifn- $\gamma$ , no hepatic damage was detected in infected RasGEF1b(Hc)-KO mice. Taken together, these results revealed that RasGEF1b is not essential for systemic parasite control during the acute phase of *T. cruzi* infection, but may act as a negative regulator of Ifn- $\gamma$  and Il-6 production in a cell-specific manner. Considering that myocarditis is a major cause of morbidity among chagasic patients, we generated conditional knockout mice from RasGEF1b on cardiomyocytes [RasGEF1b(Cm)-KO]. We have shown that RasGEF1b is the most abundant member of the RasGEF1 family in the heart and in cardiomyocytes. During the acute phase of *T. cruzi* infection, RasGEF1b(Cm)-KO mice survive but show a delay in the peak of parasitemia. Our data suggest an *in vivo* role of RasGEF1b in cells

of hematopoietic origin and in cardiomyocytes during the acute phase of Chagas disease.

## 1 Fundamentação teórica

### 1.1 Doença de Chagas: distribuição, etiologia e tratamento

O protozoário parasito *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da doença de Chagas. O levantamento mais recente da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2017) estima que há entre 6 e 7 milhões de pessoas infectadas pelo parasito em todo o mundo, a maioria ocorrendo na América Latina. Nesta região do globo terrestre é onde ocorre a transmissão por meio do vetor triatomíneo (Figura 1), que pode conter em suas fezes as formas tripomastigotas infectivas do *T. cruzi*. Por esta via de contaminação, o parasito entra no organismo do hospedeiro por meio do local da picada do triatomíneo hematófago (Brenner, 1973). A infecção também pode ocorrer por via oral, através de alimentos contaminados, transfusão de sangue; transplante de órgãos; via congênita ou ainda por acidentes laboratoriais. No entanto, a transmissão na natureza ainda é a mais expressiva (Organization, 2014).

No ciclo de transmissão na natureza, após a entrada dos tripomastigotas metacíclicos (forma alongada dotada de um flagelo) pelo local da picada do triatomíneo, o parasito entra nas células do hospedeiro, ficando inicialmente no vacúolo parasitóforo (Teixeira *et al.*, 2006). Após o rompimento do vacúolo, o parasito se diferencia na forma replicativa (amastigota desprovida de flagelo), que se multiplica no citoplasma da célula por fissão binária e finalmente diferenciam-se em tripomastigotas. Seguido ao rompimento da célula parasitada, principalmente devido à intensa movimentação dos parasitos, as formas tripomastigotas sanguíneas são liberadas, podendo invadir outras células (revisto por Andrade e Andrews, 2005; Teixeira *et al.*, 2006). No vetor triatomíneo, ao alimentar-se do sangue contendo as formas sanguíneas do *T. cruzi*, ocorrerá a diferenciação dos tripomastigotas em epimastigotas, que se multiplicam no intestino médio do inseto. A passagem do parasito pelo reto do triatomíneo permite a sua transformação em tripomastigotas metacíclicas, que estarão contidas nas fezes do vetor, que poderão infectar novos hospedeiros vertebrados e reiniciar o ciclo (Brenner, 1973).



**Figura 1. Distribuição global dos indivíduos infectados por *Trypanosoma cruzi*. (Adaptado de Ribeiro et al., 2012).** Inicialmente restrita à região da América Latina, os indivíduos infectados por *T. cruzi* atualmente podem ser encontrados em outras partes do globo, como América do Norte, Austrália e Europa.

A doença de Chagas consiste de duas fases. No período inicial da infecção é possível detectar tripomastigotas do *T. cruzi* no sangue (Brenner, 1961) e os indivíduos podem desenvolver sintomas comuns a outros quadros infecciosos como febre, dores de cabeça, nos músculos ou no abdômen (Organization, 2014). Outros acometimentos como conjuntivite, hepatoesplenomegalia e irritação nas meninges são também observados, além de ser possível detectar o parasito em vários órgãos e tecidos como fígado, baço, tecido adiposo e coração (revisto por Machado *et al.*, 2012). Após a resolução da resposta inflamatória inicial, o paciente entra na fase crônica. Esta, por sua vez, pode ocorrer sem o aparecimento de sinais clínicos por toda a vida do paciente (fase indeterminada) ou se manifestar nas formas cardíaca, digestiva ou neurológica (Tanowitz *et al.*, 1992; revisado por Machado *et al.*, 2012)

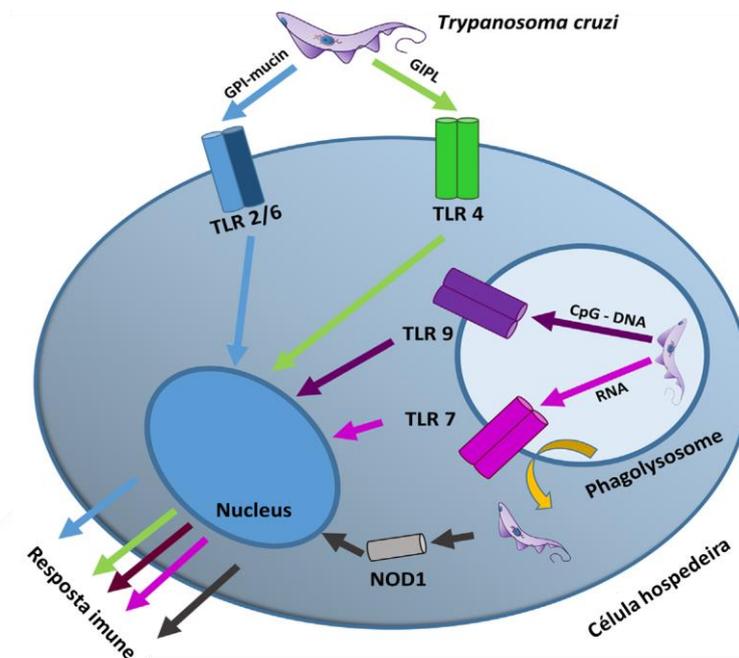
Atualmente, duas abordagens são exploradas no contexto do combate à doença de Chagas. A primeira seria a medida profilática por meio de vacina, que ainda não foi desenvolvida (Sales Junior *et al.*, 2017). Já no contexto de tratamento com drogas tripanocidas, até o momento apenas duas tem seu uso aprovado (Benzonidazol e Nifurtimox). Estes medicamentos tem uma maior eficácia (cerca de 50 a 80%) na cura da infecção quando adequadamente utilizados na fase aguda, tendo menor percentual de

eficácia em indivíduos na fase crônica (de 8 a 20%) (Rodrigues Coura e De Castro, 2002; Rocha *et al.*, 2007). Em 2017 foi publicada uma revisão que reúne os vários trabalhos e iniciativas para o desenvolvimento de medicamentos e descoberta de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas (Sales Junior *et al.*, 2017), mostrando o extenso esforço da comunidade científica em trazer melhores soluções para uma das maiores doenças tropicais negligenciadas do mundo (Organization, 2014).

## 1.2 Aspectos gerais da resposta imune na Doença de Chagas

Na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* há a ativação da resposta imune, inicialmente com eventos relacionados à imunidade inata (Golgher e Gazzinelli, 2004). Tais eventos incluem: 1) reconhecimento do parasito por células como macrófagos e células dendríticas (DCs, do inglês *dendritic cells*); 2) ativação de vias de sinalização inflamatória; 3) produção de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas; 4) efeitos sistêmico e tecidual desencadeado pela ação dos mediadores (Tarleton, 2007; Junqueira *et al.*, 2010; Kayama e Takeda, 2010).

O reconhecimento de microorganismos patogênicos pelas células da imunidade inata ocorre por meio de um número limitado de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs, do inglês *pattern recognition receptor*) capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*). Na resposta ao *T. cruzi*, o reconhecimento de PAMPs do parasito por células do hospedeiro ocorre por meio de duas classes de PRRs: os receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll-like receptors*) e receptores do tipo NOD (NLRs, *Nod-like receptors*) (Figura 1) (Cardoso *et al.*, 2015). Estudos feitos em modelo animal murino já identificaram pelo menos quatro PAMPs derivados de *T. cruzi* e seus respectivos TLRs: âncoras de glicosilfosfatidilinositol (tGPI-mucinas) reconhecidas por TLR2 (Ropert e Gazzinelli, 2000; Campos *et al.*, 2001); fragmentos de DNA ricos em ilhas CpG, para TLR9 (Bafica *et al.*, 2006; Bartholomeu *et al.*, 2008); RNA reconhecido por TLR7 (Caetano *et al.*, 2011) e glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs) reconhecido por TLR4 (Oliveira *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2007). Além desses receptores, foi demonstrada a importância de NOD1 na resistência do hospedeiro ao *T. cruzi* (Silva *et al.*, 2010), porém nenhum agonista do parasito para aquele receptor foi descrito.



**Figura 2. Principais receptores da resposta imune inata reconhecedores de PAMPs do *T. cruzi* (Modificado de Cardoso et al., 2015).** O reconhecimento do *T. cruzi* pelo sistema imune inato do hospedeiro ocorre por meio dos receptores do tipo Toll (TLRs) e receptor NLR (NOD1), sendo a sinalização mediada por este último ainda pouco caracterizado no contexto da infecção. Pelo menos quatro moléculas conservadas do *T. cruzi* ativam diferentes receptores TLRs e disparam vários mecanismos da resposta imune.

De modo geral, a ligação dos PAMPs aos seus respectivos TLRs leva à ativação de fatores de transcrição relacionados à resposta imune. A cascata de sinalização iniciada ao nível dos receptores é bastante complexa e envolve uma série de proteínas adaptadoras (proteínas que se ligam ao domínio intracelular dos TLRs) que podem variar dependendo do ligante e do TLR associado. Há quatro moléculas adaptadoras descritas para a sinalização via TLR, a saber: MyD88 (do inglês *myeloid differentiation primary response gene 88*); a proteína associada ao TIR (TIRAP, do inglês *Toll/interleukin-1 receptor adapter protein*) também chamada de proteína adaptadora tipo MyD88 (MAL, do inglês *MyD88-adaptor-like protein*); proteína adaptadora que induz IFN- $\beta$  que contém domínio TIR (TRIF do inglês *TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$* ) e a molécula adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM, do inglês *TRIF-related adaptor molecule*). MyD88 é uma molécula fundamental para a sinalização de todos os TLRs exceto para o TLR3, que nesse caso sinaliza através do recrutamento de TRIF (Akira e Takeda, 2004). Após a ativação do receptor iniciada

pelo reconhecimento de seu PAMP cognato, MyD88 se associa à porção citoplasmática do TLR (domínio TIR) e recruta diversas proteínas e cinases que disparam a ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B e AP1, assim como das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs, do inglês *mitogen-activated protein kinases*), resultando na regulação da expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória (Akira e Takeda, 2004).

Seguida da ativação gênica pelos fatores de transcrição, haverá a produção de diferentes citocinas pró-inflamatórias por células da imunidade inata (Junqueira *et al.*, 2010). Na fase inicial da infecção, macrófagos e DCs irão produzir altos níveis de Il-12, que por sua vez irá ativar a síntese de Ifn- $\gamma$  por diferentes populações celulares: células *natural killer* (NK), linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Rottenberg *et al.*, 1988; Silva *et al.*, 1995). Ifn- $\gamma$  desempenha um papel central no controle do parasito (Rottenberg *et al.*, 1993). A geração de um mecanismo efetor mais eficiente para o controle das formas intracelulares e circulantes do *T. cruzi* é dependente de Ifn- $\gamma$ , como a ativação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que é produzida em macrófagos ativados por esta citocina e é responsável pela conversão enzimática de L-arginina em óxido nítrico (NO), que é citotóxico ou citostático para microrganismos intracelulares (Langermans *et al.*, 1992; Vespa *et al.*, 1994). A produção de Il-12 e Ifn- $\gamma$ , juntamente com células apresentadoras de antígeno (DCs) irão fazer a ponte entre imunidade inata e adquirida, levando à expansão de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Essas células T também são capazes de produzirem Ifn- $\gamma$  o que amplifica a expansão de mais células T (Torricco *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1995; Aliberti *et al.*, 1996).

Durante a infecção pelo *T. cruzi*, macrófagos e monócitos são a principal fonte de Tnf (Nathan, 1987), citocina esta que amplifica a produção *in vivo* de Ifn- $\gamma$ , gerando um mecanismo de retroalimentação positiva em macrófagos. Além disso, Tnf contribui indiretamente para a indução da síntese de NO, sendo também importante para ativação de macrófagos que irão controlar o parasito (Silva *et al.*, 1995).

A IL-6 também é um importante fator de proteção durante a infecção pelo *T. cruzi*, participando do controle do parasito (Gao e Pereira, 2002). Esta citocina pode também estar envolvida na regulação da migração linfocitária pelos vasos sanguíneos por ser capaz de induzir moléculas de adesão em células endoteliais (Erdmann *et al.*, 2016).

Em indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, observa-se intenso infiltrado mononuclear no local da infecção e nos tecidos parasitados. Esse fenômeno se relaciona

intrinsecamente com a produção de quimiocinas, moléculas reconhecidas por receptores de superfície de leucócitos que irão mediar o recrutamento destas células para o tecido infectado (Teixeira *et al.*, 2002). Dentre as várias quimiocinas produzidas em resposta ao *T. cruzi*, a Ccl2 é uma molécula crítica para o recrutamento de monócitos, podendo também recrutar linfócitos T (Loetscher *et al.*, 1994; Kuziel *et al.*, 1997; Paiva *et al.*, 2009). Ccl2 é essencial para sobrevivência e controle do parasitismo tecidual acarretado pela infecção pelo *T. cruzi* (Serbina *et al.*, 2008); Paiva *et al.*, 2009). Macrófagos residentes são importantes produtores de quimiocinas, incluindo a Ccl2 (Almeida e Gazzinelli, 2001).

A intensa inflamação induzida pelos mecanismos supracitados é modulada pela produção de citocinas regulatórias tais como Il-10 e Tgf- $\beta$ , irão inibir: a ativação de macrófagos mediada por Ifn- $\gamma$  e, conseqüentemente, a inibição da produção de NO; produção de quimiocinas e diferenciação de células produtoras de Ifn- $\gamma$  (Silva *et al.*, 1992). Além disso, Il-10 é um importante fator na proteção contra miocardite induzida pela infecção por *T. cruzi* (Roffê *et al.*, 2010). O Tgf- $\beta$  também está associado a outros importantes eventos na doença de Chagas, tais como na formação de fibrose (Araújo-Jorge *et al.*, 2002; Waghbi *et al.*, 2002) e no processo de invasão celular (Ming *et al.*, 1995). Deste modo, o equilíbrio entre a produção de Ifn- $\gamma$  e Il-10 resulta em uma resistência à infecção (Cardillo *et al.*, 1996; Machado *et al.*, 2012).

Além do controle do parasito circulante mediado pelos macrófagos, há também uma resposta tecidual intensa, uma vez que o *T. cruzi* apresenta mecanismos de evasão da resposta imune e consegue chegar aos tecidos (Cardoso *et al.*, 2015). O parasito pode ser encontrado nos mais diferentes locais como no fluido cérebro-espinhal (Diazgranados *et al.*, 2009), no tecido adiposo (Andrade e Silva, 1995), fígado (Cencig *et al.*, 2011) e coração (Veloso *et al.*, 2008). Especificamente no fígado, ocorre uma resposta imune local desempenhada pelas células de Kupffer e diferentes tipos de células NK e linfócitos T (Sardinha *et al.*, 2006). Sabe-se que uma exacerbada produção de Ifn- $\gamma$  neste tecido pode acarretar dano hepático e desencadear mecanismos de morte nas células parenquimais (Knight *et al.*, 2007; Horras *et al.*, 2011).

### **1.3 Miocardite na doença de Chagas e o envolvimento dos cardiomiócitos**

Dentre as manifestações crônicas, a cardiomiopatia é a principal forma desenvolvida nos portadores da doença de Chagas, acometendo cerca de 30 a 40% dos

indivíduos (Rassi e Marin-Neto, 2010). Diferentes disfunções podem acometer o tecido cardíaco tais como arritmias, aneurisma ventricular, tromboembolismo e falência cardíaca, podendo em alguns casos levar à morte súbita. Ainda não há um completo entendimento de como essa miopatia crônica se desenvolve, havendo na literatura a descrição de potenciais mecanismos patofisiológicos (Dias *et al.*, 1956; Marin-Neto *et al.*, 2007).

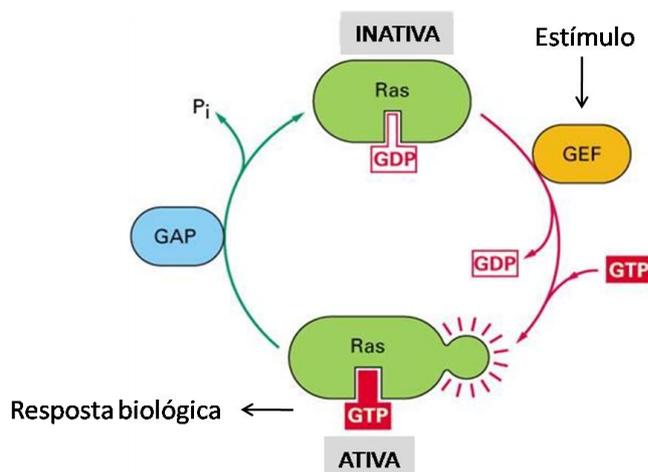
O *T. cruzi*, apesar de ter capacidade de infectar praticamente qualquer tipo celular, possui um tropismo pelo tecido muscular cardíaco (Brener, 1973; Hall *et al.*, 2000). No coração, além de parasitar células como macrófagos residentes e células endoteliais, o parasito invade cardiomiócitos (Meirelles *et al.*, 1999; Calvet *et al.*, 2016). De fato, há uma expressiva alteração no perfil de expressão gênica e proteica em cardiomiócitos quando infectados pelo *T. cruzi* (Mukherjee *et al.*, 2003; Goldenberg *et al.*, 2009). Citocinas inflamatórias tais como Tnf, Il-1 $\beta$  e Tgf- $\beta$ , além de quimiocinas Ccl2, Ccl3, Ccl5 e Cxcl2 são produzidas por cardiomiócitos infectados com *T. cruzi* (Machado *et al.*, 2008).

#### **1.4 Proteínas Ras no contexto da resposta imune**

As proteínas Ras, inicialmente estudadas no campo de pesquisas do câncer (Chien *et al.*, 1979), emergiram posteriormente para outras diversas áreas da biologia (Takai *et al.*, 2001). Atualmente, estas moléculas são bem caracterizadas quanto à sua estrutura, classificação e função celular (Hancock, 2003).

Proteínas Ras são pequenas GTPases monoméricas que atuam como interruptores moleculares capazes de responder a diversos estímulos extracelulares tais como fatores de crescimento, citocinas e hormônios (Vojtek e Der, 1998). É uma extensa superfamília composta por mais de 150 proteínas, subdivididas em cinco famílias: Ras, Rho, Rab, Ran e Arf (Wennerberg *et al.*, 2005). Estas proteínas estão envolvidas em processos celulares tais como progressão do ciclo celular, polaridade e movimento celular, proliferação e diferenciação, transporte vesicular e apoptose (Vigil *et al.*, 2010). Ainda, algumas proteínas dessa superfamília participam da sinalização na imunidade e inflamação (Johnson e Chen, 2012).

A ativação ou regulação dessas proteínas ocorre com o auxílio de dois tipos de moléculas: os fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEF, do inglês *guanine exchange factor*) e as proteínas ativadoras de GTPase (GAP, do inglês *GTPase-activating proteins*). De modo geral, uma Ras se encontra em estado inativo quando ligada à GDP e para que seja ativada e desempenhe seu papel, é necessário que um GEF catalise a remoção do GDP, tornando possível dessa maneira a ligação espontânea de um GTP (Figura 3). O controle dessa ativação é desempenhado pelas proteínas GAP, que aceleram a reação de hidrólise do GTP pela Ras. Assim, GTP é convertido a GDP e o estado inativo da proteína é então restabelecido. É importante ressaltar que a afinidade de Ras por ambos os nucleotídeos guanina (GTP ou GDP) é similar e a ligação espontânea com GTP ocorre pelo fato de sua concentração citoplasmática ser aproximadamente dez vezes maior do que a de GDP (Bos *et al.*, 2007).



**Figura 3. Esquema geral de regulação de uma Ras-GTPase.** (Adaptado de Alberts et al, 2010). Estímulos extracelulares podem ativar fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEFs), que por sua vez ativam uma RasGTPase ligada a GDP. A ativação ocorre devido a remoção do GDP, permitindo assim a ligação de um GTP. A regulação desta ativação é feita por uma proteína ativadora de GTPase (GAP), que potencializa a atividade de GTPase de Ras. Após a hidrólise do GTP, Ras retorna ao estado inativo ligado a GDP.

Os GEFs apresentam uma seletividade para cada família de Ras GTPases. Por exemplo, os fatores de troca de guanina da família Ras (RasGEFs, *Ras associated GEFs*) compartilham em sua estrutura protéica um domínio catalítico carboxi-terminal denominado CDC25 (*cell division cycle 25 homology domain*) ou domínio RasGEF; e

uma porção N-terminal, RasGEF-N (Quilliam *et al.*, 2002). De maneira similar, proteínas GAP também apresentam especificidade por uma determinada família de Ras-GTPase (Bos *et al.*, 2007).

A ativação dos diferentes RasGEFs pode ser dada por estímulos, tais como a fosforilação de proteínas e lipídios, o fluxo de cálcio e a geração de segundos mensageiros, como diacilglicerol (DAG) (Bos *et al.*, 2007). Este último mecanismo pode ser observado em fatores de troca de guanina da família RasGRP, que estão envolvidos na sinalização em células imunes (Ebinu *et al.*, 1998)

A sinalização mediada por proteínas Ras em células imunes pode regular a expressão de moléculas de MHC (*major histocompatibility complex*), citocinas e fatores de crescimento importantes para desenvolvimento, crescimento e função de células hematopoiéticas (Weijzen *et al.*, 1999). Nestas células, Vav1 é uma RhoGEF que está relacionada a regulação do citoesqueleto de actina durante a fagocitose (Hall *et al.*, 2006). Ainda, o envolvimento de outros GEFs em células imunes foi demonstrado. Por exemplo, RasGRP são GEFs expressos em diferentes tipos de leucócitos e estão envolvidos na ativação dessas células. RasGRP1 é predominantemente expresso em linfócitos T e parece regular a diferenciação de células do timo (timócitos) por meio de sinalização mediada por receptores de células T (TCR, do inglês *T cell receptor*) (Dower *et al.*, 2000; Ebinu *et al.*, 2000). Outros RasGRPs são ainda implicados em vias de MAPKs (Dower *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2014).

### **1.5 O fator de troca de guanina RasGEF1b**

O RasGEF1b, um fator de troca de nucleotídeos guanina ativado em vias de TLRs (Ferreira *et al.*, 2002; Silva *et al.*, em preparação), é a molécula alvo deste estudo. A família RasGEF1 é composta por três membros, a saber RasGEF1a, RasGEF1b e RasGEF1c. Evolutivamente, RasGEF1b é uma proteína altamente conservada em diferentes espécies como o nematódeo *Caenorhabditis elegans*, zebrafish, camundongos e humanos (Epting *et al.*, 2007). Em células de mamíferos é encontrada principalmente em endossomos primários, podendo transitar entre esses e endossomos tardios (Andrade *et al.*, 2010). O gene *Rasgef1b* localiza-se no cromossomo 5 do genoma de camundongos (Andrade *et al.*, 2010) e no cromossomo 4 em humanos (Bonnet *et al.*, 2010).

RasGEF1b parece ter uma implicação no sistema nervoso central. Análises da expressão de *Rasgef1b* durante o desenvolvimento de *Danio rerio* (zebrafish) mostraram que este gene é expresso de forma variável em estruturas do sistema nervoso do embrião de acordo com o tempo/estágio de desenvolvimento (Epting *et al.*, 2007).

Inicialmente o *Rasgef1b* foi identificado como um gene cuja expressão é induzida no coração de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, assim como em macrófagos murinos ou humanos estimulados com tGPI-mucina derivadas deste parasito (Ferreira *et al.*, 2002). Mais tarde, o mesmo grupo em colaboração com o nosso observou que o *Rasgef1b* tinha sua expressão induzida no baço de animais infectados com *T. cruzi* e por outro protozoário parasito, o *Plasmodium chabaudi*. Ademais, foi ainda sugerido que sua expressão *in vivo* durante a infecção por esses parasitos ocorria de modo dependente de MyD88, TRIF e Ifn- $\gamma$  (Andrade *et al.*, 2010).

A caracterização funcional da região promotora do gene *Rasgef1b* vem sendo estudada em nosso laboratório. Evidências têm apontado que a região mínima ativada por TLRs através de MyD88 e Mal/TIRAP abriga elementos regulatórios de fatores de transcrição críticos associados à resposta imune, tais como o NF- $\kappa$ B e o Sp-1 (Leão *et al.*, manuscrito em preparação). Estudos realizados nos últimos dois anos revelaram a existência de um microRNA circular de RasGEF1b que pode ser induzido em macrófagos murinos imortalizados (células RAW264.7) estimulados com LPS (Ng *et al.*, 2016). Os dados mais recentes gerados por nosso grupo sugerem ainda que o RasGEF1b é uma molécula que medeia a expressão de genes inflamatórios, incluindo a Kc/Cxcl1, que é uma quimiocina responsável pelo recrutamento de neutrófilos (Silva *et al.*, manuscrito em preparação).

## 1.6 Camundongos nocautes e o sistema Cre/loxP

O uso de animais mutantes para estudos de perda de função sucedeu duas descobertas importantes na biologia: a recombinação homóloga e o isolamento de células tronco embrionárias murinas (Hall *et al.*, 2009). Assim, para a geração de animais cujas células sejam alteradas quanto a um determinado gene alvo, é necessária a construção de um vetor para a região gênica de interesse e a inserção deste em células tronco embrionárias. Dentro das células, a construção plasmidiana será alinhada à região de interesse através de mecanismos de reparo do DNA, possibilitando a recombinação

homóloga e consequente inserção da sequência mutante no genoma (Capecchi, 1989a; b)

O uso de camundongos como modelos para estudar os mais variados fenômenos biológicos é amplamente aceito na comunidade científica, uma vez que esses animais compartilham cerca de 99% dos genes de humanos, além de serem mais fáceis de manipular e gerarem menores custos à pesquisa, comparados a outros modelos (Capecchi, 1994; Vogel, 2007).

Desde os primeiros registros de manipulação do genoma de camundongos para o desenvolvimento do método para obtenção de um camundongo nocaute (Capecchi, 1989), até os dias atuais, cerca de metade dos genes do genoma de camundongos foi mutado para geração de animais nocautes (Hall *et al.*, 2009). Estes modelos, sem dúvidas, são ferramentas essenciais para pesquisa em todas as áreas das ciências biológicas (Vogel, 2007). No entanto, dependendo da função desempenhada pela molécula mutada, algumas complicações podem surgir em modelos convencionais de recombinação homóloga. De acordo com informações do NIH (2015), cerca de 15% dos mutantes deficientes em todas as células gerados apresentam letalidade embrionária.

Uma ferramenta que surgiu para contornar esse problema foi o sistema de recombinação “Cre/loxP”, que permite a geração de animais com deleção gênica condicionalmente tecido-específica (Sauer e Henderson, 1990). Esta estratégia é baseada no sistema de recombinação sítio específica da recombinase Cre, uma enzima derivada de bacteriófagos que reconhece regiões flanqueadas por sítios “loxP” (*Floxed*, do inglês, *sequence flanked by loxP*). Uma vez que a sequência de interesse esteja flanqueada por dois sítios “loxP” (*flox*, do inglês *flanked by loxP*), posicionados no mesmo sentido, a recombinase Cre irá catalizar a clivagem do fragmento de DNA situado entre os sítios loxP (Sauer e Henderson, 1988). O local ou momento em que a Cre será expressa é controlado devido a diferentes formas de regulação de promotores, tais como aqueles que são ativados em tecido específicos (Hall *et al.*, 2009).

Assim, a geração de camundongos nocautes condicionais baseados no sistema Cre/loxP pode ocorrer a partir de duas linhagens transgênicas parentais: uma cuja o gene alvo tem uma sequência flanqueada por loxP em todo o genoma (genericamente denominado de “flox”); e outra linhagem contendo uma construção onde a recombinase Cre tem expressão controlada por um promotor gênico de expressão tecido específica. De um modo geral, a partir da geração “F2” do cruzamento dessas duas linhagens é possível obter camundongos que expressarão a Cre em células específicas que,

consequentemente, terão a recombinação do gene alvo no tecido desejado (Friedel *et al.*, 2011).

Há na literatura vários trabalhos que utilizam modelos de deleção condicional para investigar o papel de moléculas em tecidos ou células específicas (revisado por (Kwan, 2002). Mais especificamente, em 2005 foi realizado um estudo de infecção experimental com *T. cruzi* utilizando camundongos com deleção condicional de endotelina 1 (ET-1) em cardiomiócitos e em células endoteliais (Tanowitz *et al.*, 2005). Esta molécula é um peptídeo vasoativo sintetizado por várias células, como cardiomiócitos e células endoteliais (Goto, 2001) e já foi demonstrado que a ET-1 participa de diversas vias de sinalização relacionadas à disfunção cardiovascular, inclusive aquelas relacionadas à doença de Chagas (Salomone *et al.*, 2001; Mukherjee *et al.*, 2003). Neste modelo os pesquisadores puderam inferir que a endotelina proveniente de cardiomiócitos, mas não a sintetizada por células endoteliais, foi importante para que houvesse um melhor remodelamento no tecido cardíaco dos animais infectados com *T. cruzi* (Tanowitz *et al.*, 2005).

Camundongos com deleção de RasGEF1b foram gerados utilizando a estratégia de recombinação Cre-loxP, sendo a recombinação direcionada para todos os tecidos (nocaute total ou RasGEF1b-KO) ou para as células do sistema hematopoiético (nocaute condicional hematopoiético ou RasGEF1b(Hc)-KO). Ambas as linhagem são férteis e não apresentam anormalidades anatômicas aparentes. Os camundongos RasGEF1b-KO apresentam ninhadas muito reduzidas e comportamento aparentemente mais agitado, enquanto que os animais RasGEF1b(Hc)-KO possuem ninhadas semelhantes às de animais C57BL/6 e não aparentam ter alterações comportamentais (Silva *et al.*, manuscrito em preparação).

## 2. Justificativa e hipótese

Há muito vem sendo estudado sobre as características da resposta imune à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (Vespa *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1995; Aliberti *et al.*, 1996; Talvani *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2012; Dutra *et al.*, 2014). Sucedendo a infecção do hospedeiro mamífero há o reconhecimento do parasito por células imunes, tais como macrófagos, através da interação de moléculas de superfície de ambas as células. Receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, tais como os TLRs, são ativados por diferentes PAMPs deste parasito e deflagram vias de sinalização intracelular, com conseqüente ativação transcricional de diferentes genes, formando um complexa rede de ativação de moléculas implicadas na resposta inflamatória (Watanabe Costa *et al.*, 2016).

*Rasgef1b* é um gene cuja expressão foi observada em macrófagos estimulados por âncoras de glicosilfosfatidilinositol de *Trypanosoma cruzi* (tGPI) assim como em tecidos de camundongos infectados com esse parasito (Ferreira *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2010). Estudos desenvolvidos em nosso laboratório tem demonstrado que *Rasgef1b* também é induzido por outros agonistas TLRs, como Pam3CSK4, LPS e CpG-ODN (respectivamente, TLR2, TLR4 e TLR9).

Contudo, a função de RasGEF1b na resposta imune inata, sobretudo durante a infecção por *T. cruzi*, ainda não foi investigada. Além disso, a expressão induzida de RasGEF1b no coração de camundongos infectados por *T. cruzi* suscita também a questão se RasGEF1b exerce funções no tecido cardíaco, um importante tecido alvo no qual o parasito se aloja, prolifera e causa uma resposta inflamatória.

Dadas essas evidências, nós hipotetizamos que RasGEF1b desempenha um papel na resposta imune inata ao *T. cruzi*.

Desse modo, investigar a função do RasGEF1b em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* pode contribuir para fornecer evidências da função desse GEF na resposta imune durante a infecção disparada pelo *T. cruzi*.

### 3. Objetivos

O objetivo principal deste estudo foi investigar o papel de RasGEF1b na resposta imune durante a fase aguda da infecção por *Trypanosoma cruzi*.

#### 3.1 Objetivos específicos

- 1) Determinar a taxa de infecção, multiplicação intracelular e sobrevivência de tripomastigotas em macrófagos selvagens e deficientes de RasGEF1b após infecção com a cepa Y de *T. cruzi*;
- 2) Verificar a produção de óxido nítrico e Il-6 em culturas de macrófagos selvagens e deficientes de RasGEF1b após infecção com a cepa Y de *T. cruzi*;
- 3) Avaliar a os níveis do mRNA de RasGEF1b no coração, baço e fígado de camundongos C57BL/6 (WT) infectados ou não com a cepa Y de *T. cruzi*;
- 4) Determinar a mortalidade e parasitemia em camundongos C57BL/6 (WT) e com deleção ubíqua (RasGEF1b-KO) ou hematopoiético-específica [RasGEF1b(Hc)-KO] infectados com a cepa Y de *T. cruzi*;
- 5) Quantificar citocinas no soro de camundongos WT e com deleção ubíqua (RasGEF1b-KO) ou hematopoiético-específica [RasGEF1b(Hc)-KO] infectados com a cepa Y de *T. cruzi*;
- 6) Quantificar citocinas *ex vivo* em camundongos C57BL/6 (WT) e com deleção ubíqua (RasGEF1b-KO) ou hematopoiético-específica [RasGEF1b(Hc)-KO] infectados com a cepa Y de *T. cruzi*;
- 7) Analisar a patologia cardíaca e hepática deflagrada por *T. cruzi* em camundongos WT e RasGEF1b(Hc)-KO
- 8) Gerar e caracterizar camundongos com deleção condicional de *Rasgef1b* em cardiomiócitos, i.e, camundongos RasGEF1b(Cm)-KO.
- 9) Avaliar a mortalidade e parasitemia em camundongos RasGEF1b(Cm)-KO infectados com a cepa Y de *T. cruzi*;

## 4. Material e Métodos

### 4.1 Animais

Camundongos C57BL/6 (WT, *wild type*) foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO, UFMG). Camundongos *Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>*, e camundongos com deleção de RasGEF1b em todos os tecidos (*Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>/CMV-Cre+*; abreviado RasGEF1b-KO) ou com deleção condicional em células hematopoiéticas [*Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>;Vav-iCre+*; abreviado RasGEF1b(Hc)-KO], ambos em background C57BL/6, foram gerados pelo cruzamento de camundongos *Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>* com camundongos transgênicos CMV-Cre ou Vav-i-Cre, respectivamente (Silva et al., manuscrito em submissão). Foram utilizados animais com idade de 8 a 12 semanas, machos ou fêmeas. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo CEUA, UFMG N° 69/2014).

### 4.2 Genotipagem dos camundongos

#### 4.2.1 Obtenção de DNA genômico

Para monitoramento do genótipo dos animais utilizados nos experimentos, foram realizadas PCRs a partir de DNA genômico obtido da cauda dos animais. Brevemente, um pequeno fragmento da cauda (2-5 mm) foi incubado em tampão de digestão (5 mM EDTA, pH 8,0; 200 mM NaCl; 100mM Tris, pH 8,0; 0,2% SDS; 0,4 mg/mL de proteinase K, LGC Biotecnologia). Após incubação *overnight* à 55°C, a proteinase K foi inativada a 85°C por 15 min, seguido de centrifugação (16.000 x g, 15 min). A fase aquosa foi então submetida à precipitação com isopropanol (Sigma-Aldrich) e centrifugação (16.000 x g, 10 min) para obtenção do sedimento de DNA. Em seguida, o sedimento foi lavado em etanol 70% (Sigma-Aldrich), centrifugado a 16.000 xg por 5 min e por fim solubilizado em água livre de DNase à 55°C por 2h. O DNA foi então armazenado à -20°C até o uso.

#### 4.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O genótipo dos camundongos foi verificado por meio de PCR do DNA genômico do tecido obtido da cauda utilizando oligonucleotídeos para região gênica de *Rasgef1b* alvo da recombinação (Tabela 1). Na reação de PCR foram utilizados 2 pmol de cada oligonucleotídeo (*forward* e *reverse*) em reação contendo solução tampão (PCR Buffer I0, Phoneutria), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Phoneutria), 0,2 mM de dNTPs (dATP; dCTP; dGTP; dTTP) (Invitrogen) e 1U de Taq DNA polimerase (Phoneutria). As reações foram incubadas no termociclador MyCycler™ (Bio-Rad) e os fragmentos amplificados foram fracionados em gel de agarose 1,5%, contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo (Sigma-Aldrich). Para inferência do tamanho relativo das bandas de DNA foi utilizado o *1Kb plus DNA ladder* (Invitrogen). Os géis foram visualizados em transluminador de luz UV (MultiDoc-It Digital Imaging System, UVP) e as imagens capturadas através do software do mesmo (UVP).

#### 4.3 Teste de contaminação por *Mycoplasma* sp.

Todo material de cultura de células e parasitos utilizado neste trabalho (células L929 e LLC-MK2; cultura de tripomastigotas de *T. cruzi*) foi monitorado quanto à contaminação por bactérias do gênero *Mycoplasma* por meio de PCR (Timenetsky *et al.*, 2006). Após fervura da suspensão de células por 10 min, 2 µL do lisado foi utilizado em reação de PCR contendo tampão (PCR Buffer I0, Phoneutria), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Phoneutria); 0,2 mM de dNTPs; 0,625 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria) e 5 pmol dos oligonucleotídeos MGSO e GPO3 (Tabela 1), em um volume final de 25 µL. As reações foram incubadas e processadas como descrito no item 4.2.2.

#### 4.4 Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea

Macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) de camundongos WT ou RasGEF1b-KO foram obtidos como descrito (Marim *et al.*, 2010). Os animais foram previamente anestesiados com uma solução de quetamina (80 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg), administrada via intraperitoneal e em seguida eutanasiados por deslocamento cervical. Os fêmures e tíbias foram cuidadosamente extraídos e transferidos para um tubo de polipropileno contendo etanol 70%, sendo mantidos no máximo um minuto, e

então transportados para capela de fluxo laminar em ambiente estéril. Os ossos foram transferidos e mantidos em PBS estéril enquanto a remoção do excesso de tecido muscular foi feita com auxílio de gaze estéril, embebida em álcool 70%. Com o auxílio de uma seringa com agulha foi feito o *flush* das células precursoras da medula óssea diretamente para um tubo de polipropileno estéril e centrifugadas a 200 x g por 10 minutos a 4°C. As células foram ressuspendidas em meio R20/30, i.e., meio RPMI 1640 contendo 20% SFB, 30% de sobrenadante de células L929 (fonte de M-CSF), 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 50µM de 2-mercaptoetanol. Após a contagem das células por meio do método de exclusão de azul de tripan, 10 mL de uma suspensão de  $7 \times 10^6$  células foram transferidos para placas de Petri de poliestireno (JProlab). O tempo de diferenciação das células a macrófagos foi de 7 dias, a 37°C, em incubadora com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>, sendo o meio substituído a cada dois dias. Ao final, o sobrenadante foi aspirado e a cultura de células lavada com 5 mL de PBS estéril aquecido (37°C) para eliminar as células não aderentes. Posteriormente, foram adicionados cerca de 3 mL de PBS/EDTA 10 mM gelado à cultura, seguido de incubação no gelo por 5 minutos. As células aderidas na placa, já diferenciadas amacrófagos, foram removidas por ressuspensão e transferidas para um tubo de polipropileno estéril. Os BMDMs foram centrifugados a 200 x g por 5 minutos, a 4 °C e ressuspensos em meio R5/10 (RPMI 1640 com 10% SBF, 5% de sobrenadante de células L929, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 50µM de 2-mercaptoetanol. Para os experimentos de infecção, as células foram contadas e plaqueadas em placas de 24 poços ( $5 \times 10^5$  células/ 500 µL/poço), sendo mantidas por aomenos dezoito horas de incubação em estufa a 37°C, atmosfera a 5% CO<sub>2</sub> antes do início dos experimentos.

#### 4.4.1 Citometria de fluxo

Para monitoramento da diferenciação a macrófagos, BMDMs WT e RasGEF1b-KO foram dissociados por ressuspensão em PBS/EDTA (10 mM) gelado e  $1,5 \times 10^5$  células foram transferidas para tubos de poliestireno transparente para citometria de fluxo para ensaio de detecção dos marcadores de superfície F4/80 e CD11b. A cada tubo foram adicionados anticorpo monoclonal anti-receptor de Fc (FcRIII/II mAb; 2-4G.1) e a suspensão incubada a 25°C por 15 minutos. Após este tempo as células foram lavadas com PBS e então adicionados anticorpos específicos para as moléculas de superfície

diluídos em PBS. Para observar a expressão de moléculas de superfície em BMDMs, as células foram marcadas com BB515 anti-mouse CD11b (BD Pharmingen, clone M1/70) ou PE anti-mouse F4/80 (eBioscience, clone BM8). Os isotipos controles para os respectivos anticorpos utilizados foram: IgG2b de rato e IgG2a de rato - BD Pharmingen. A suspensão celular foi incubada por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas novamente com PBS e centrifugadas a 300 x g/10 minutos. Após a centrifugação as células a aquisição das células marcadas foi feita no citômetro de fluxo FACSCantoII (Becton Dickinson), e as análises feitas no programa “FlowJo” (Tree Star).

#### **4.5 Manutenção *in vitro* de *T. cruzi***

Nos experimentos *in vitro* foram utilizadas formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Os parasitos foram mantidos em cultura de células epiteliais de rim de macaco Rhesus (LLC-MK2), sendo feitas infecções semanais em garrafas de cultura de 75 cm<sup>3</sup>. As culturas foram mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, em 10 mL meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), suplementado com 2% de SFB e 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, sendo trocado diariamente. Ao 7º dia de infecção, o sobrenadante da cultura foi coletado e centrifugado por 10 minutos, 800 x g, para sedimentação das células, que foi mantida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 4 horas. Posteriormente, o sobrenadante desta centrifugação foi novamente coletado e centrifugado a 1.400 x g por 10 minutos para sedimentação dos tripomastigotas. O número de parasitos foi contado em câmara de Neubauer para infecção de BMDMs.

#### **4.6 Infecção de BMDMs com *T. cruzi***

Os BMDMs foram infectados com a cepa Y de *T. cruzi* com uma multiplicidade de infecção de 5:1 (MOI 5:1). Após incubação a 37°C por 2 horas, os parasitos não internalizados foram excluídos após lavagem das culturas de macrófagos com PBS. Para algumas análises, os BMDMs foram primados por 3 horas com 50 U ou 100 ng/mL de Ifn-γ recombinante murino (Invitrogen). O número de células infectadas e de amastigotas intracelulares foi determinado em macrófagos fixados e corados com Panótico Rápido (LB Laborclin) após 4 e 48 horas, respectivamente. O crescimento e

sobrevivência do parasito foram determinados pela contagem do número de tripomastigotas no sobrenadante do 4° ao 7° dpi.

#### **4.7 Dosagem de óxido nítrico**

O ensaio de Griess (Green *et al.*, 1982) foi conduzido para determinar as concentrações de nitrito no sobrenadante da cultura de BMDMs infectados com *T. cruzi* e no sobrenadante de células não-parenquimais hepáticas, obtidas como descrito no item 4.13. As amostras foram incubadas com o reagente de Griess (1:1) por 10 minutos à temperatura ambiente, seguida de detecção à 540 nm em leitor de placas (Multiskan, Thermo). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$ , determinados pela curva padrão de nitrito.

#### **4.8 Infecção *in vivo* com *T. cruzi***

Os camundongos foram administrados intraperitonealmente (i.p.) com PBS ou infectados com 100 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. Os parasitos foram mantidos por passagens seriadas em camundongos Swiss.

##### *4.8.1 Parasitemia e mortalidade*

A parasitemia foi determinada diariamente a partir do 7° dia até o 13° dia pós-infecção (dpi). Para tanto, 5  $\mu\text{L}$  de sangue foram colhidos de um pequeno corte na cauda e colocado sobre uma lâmina, coberta com uma lamínula de 22 x 22 mm. A preparação foi levada ao microscópio óptico (campo claro) onde a contagem foi feita em 50 campos, na objetiva de 40 vezes, como descrito (Brener, 1961). A mortalidade foi avaliada diariamente até o 40° dpi.

##### *4.8.2 Obtenção de soro e tecidos*

Camundongos WT, RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO infectados com *T. cruzi* (5, 10 e 15 dpi) ou tratados com PBS foram anestesiados com solução de quetamina (80 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg). Os animais foram então fixados e a veia porta hepática exposta para coleta do sangue com o auxílio de uma pipeta Pasteur. O

sangue foi transferido para microtubos e mantidos à temperatura ambiente. Após 30 minutos, o sangue foi centrifugado por 15 min,  $2.350 \times g$ , para separação do soro, que foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

Dos mesmos animais controle (PBS) ou infectados (10 e 15 dias pós-infecção) foram coletados coração, baço e fígado, que foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.9 Extração de RNA total**

As extrações de RNA total foram feitas utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Pequenas modificações nos procedimentos para obtenção de RNA de células ou tecidos são descritas a seguir. Para extração de RNA de BMDMs, o meio de cultura foi aspirado por sucção, seguido da adição imediata de  $500 \mu\text{L}$  de Trizol a monocamada de células em placa de 24 poços. As placas foram mantidas sob agitação durante 15 minutos em shaker orbital e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento da extração. Para obtenção de RNA de órgão (coração, baço ou fígado), os tecidos previamente congelados em nitrogênio líquido foram macerados em 1 mL de Trizol com o auxílio de homogenizador de tecidos (Omni Tissue Master OmniInternational). As etapas seguintes foram realizadas como descrito no protocolo do Trizol.

Ao final da extração, o RNA foi solubilizado em água DEPC (Invitrogen) ( $20 \mu\text{L}$  para BMDM e  $150 \mu\text{L}$  para tecido), incubado a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos seguido de ressuspensão. Uma alíquota de 1-2  $\mu\text{L}$  foi usada para quantificação em espectrofotômetro NanoDrop ou NanoDrop lite (Thermo Scientific, EUA), os quais determinam a concentração de RNA total em  $\text{ng}/\mu\text{L}$  e a razão ácido nucléico: proteína, calculada com base nas absorbâncias de 260 nm e 280 nm medidas. Todos os procedimentos foram realizados com material autoclavado, plásticos e reagentes livres de RNase.

#### **4.10 Síntese da 1ª fita de cDNA**

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de um micrograma de RNA total, que foi adicionado a uma mistura contendo  $0,5 \mu\text{g}$  de oligo-dT<sub>18</sub>, dNTPs a 10mM (Invitrogen) e água DEPC para completar um volume total de  $13 \mu\text{L}$ . Após

homogeneização, as amostras foram incubadas a 65°C durante 5 minutos, e em seguida colocadas no gelo por 1 minuto. Foram então adicionados 7 µL de uma mistura contendo 4 µL de solução tampão MMLV *first-strand buffer* (Invitrogen), 2 µL de DTT 0,1 M (Invitrogen) e 1 µL de enzima MMLV-RT (Invitrogen), obtendo-se o volume final de 20 µL. Esta solução foi incubada a 37°C por 50 minutos. Para inativação da enzima transcriptase reversa, a mistura foi incubada a 70°C por 15 minutos. As amostras foram armazenadas a -20°C ou imediatamente utilizadas para análise de expressão gênica por meio de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

#### 4.11 Análises de expressão gênica por RT-qPCR

Os critérios utilizados nos estudos de RT-qPCR foram baseados no guia de MIQE, do inglês *minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments* (Bustin et al., 2009). As RT-qPCRs foram conduzidas utilizando-se os cDNAs diluídos em água milli-Q na proporção de 1:10. Dois microlitros da amostra diluída foram adicionados a uma mistura contendo 5 µL de iTaq SYBR Green Supermix (iTaQ™ Universal SYBR® Green Supermix, Bio-Rad), 2 µL de água milli-Q e 0,5 µL de cada iniciador a 10 mM (Tabela 2). Os procedimentos foram realizados em placas de 96 ou 48 poços (Axygen), que foram seladas, vortexadas e centrifugadas a 400 x g por 5 minutos antes de serem transferidas para termociclador de tempo real (CFX96 Touch, Bio-Rad). Os dados foram analisados no CFX Manager Software (Bio-Rad) e salvos em formato Microsoft Excel para realização dos cálculos. Análises de abundância relativa de mRNA foram feitas conforme o método comparativo do ciclo limiar (Ct, do inglês *cycle threshold*), de acordo com a equação  $2^{-\Delta Ct}$ , onde  $\Delta Ct = Ct_{(\text{gene alvo})} - Ct_{(\text{Rpl32})}$ . O cálculo de *fold change* foi feito de acordo com o método de Livak  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , sendo  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{tratado})} - \Delta Ct_{(\text{controle})}$  (Livak e Schmittgen, 2001).

#### 4.12 Cultura de esplenócitos

Esplenócitos foram obtidos a partir do baço de camundongos tratados com PBS ou infectados (15 dpi), de acordo com metodologia descrita (Campos *et al.*, 2004). Resumidamente, o baço inteiro foi passado em *cell strainer* (poro de 100 µm) para separação das células, que foram mantidas em meio RPMI 1640. Após centrifugação a 400 x g, por 10 minutos, o sedimento foi gentilmente suspenso em 5 mL de tampão

ACK gelado (155 mM de cloreto de amônio, 1 mM de carbonato de potássio e 0,1 mM de EDTA), para lise de hemácias, e incubado em gelo por 5 minutos. Em seguida, 20 mL de PBS gelado foram adicionados e o tubo centrifugado por 5 minutos, 400 x g. O sobrenadante foi descartado e os esplenócitos suspensos em meio RPMI 1640 com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram cultivadas em placas de 48 poços, contendo  $2,5 \times 10^6$  células/poço, em placas de. Após 48h, os sobrenadantes de cultura foram coletados para quantificação de Il-6 e Ifn- $\gamma$  por CBA e por ELISA.

#### **4.13 Obtenção e cultivo de células não-parenquimais do fígado**

Células não-parenquimais do fígado (LNPCs, do inglês *liver non-parenchymal cells*) foram isoladas do órgão de camundongos tratados com PBS ou infectados com *T. cruzi* (15 dpi), como descrito por (Crispe, 2001), porém com algumas adaptações. Em capela de fluxo laminar, cada fígado foi cortado com tesoura em pequenos fragmentos e incubado a 37°C por uma hora, sob agitação, em 5 mL de meio RPMI contendo 10% de SFB (Gibco) e 5 mg de colagenase (Sigma-Aldrich). Após incubação, o homogenato foi transferido para um tubo de polipropileno estéril e acrescentada uma solução de PBS, 0,5% de BSA (Sigma-Aldrich) e 2 mM de EDTA (Sigma), levando ao volume final de 30 mL. O homogenato foi centrifugado por 5 minutos, a 300 x g, 4°C, e o sedimento ressuspenso em 25 mL de meio RPMI. Três ciclos de centrifugação a 60 x g por 3 minutos, 4°C, foram realizados para separação das células não-parenquimais dos hepatócitos. Ao final, o sobrenadante recuperado foi passado por *cell strainer* (poro 100 µm), centrifugado a 300 x g por 5 minutos e o sedimento suspenso em 5 mL de tampão ACK gelado para lise de hemácias. Após 5 minutos de incubação no gelo, foi adicionado 20 mL de PBS e centrifugado a 400 x g por 5 minutos. Finalmente, o sedimento contendo as células não-parenquimais do fígado foram cultivadas em placas de 48 poços ( $2,5 \times 10^6$  por poço/400 µL) em meio RPMI contendo 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%, 37°C) por 48 horas e o sobrenadante foi utilizado para dosagem de Ifn- $\gamma$  (ELISA) e de óxido nítrico (Ensaio de Griess).

#### 4.14 Dosagem de citocinas

O kit *CBA Mouse Inflammation* (BD) foi utilizado para quantificação de Il-6, Il-10, Mcp-1/Ccl2, Ifn- $\gamma$ , Tnf e Il-12p70 no soro ou sobrenadante de cultura dos esplenócitos. A aquisição dos eventos foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCanto, BD), no Centro de Pesquisa René Rachou (FIOCRUZ-MG). Os resultados foram expressos em pg/mL. As concentrações de citocinas no soro ou no sobrenadante de cultura de esplenócitos (Ifn- $\gamma$  e Il-6), LNPCs (Ifn- $\gamma$ ) ou de BMDMs (Il-6) foram também avaliados por ELISA, utilizando kits da R&D Systems. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

#### 4.15 Dosagem de transaminases hepáticas (TGO e TGP)

As enzimas transaminases glutâmica oxalacética (TGO) e pirúvica (TGP) foram dosadas no soro de camundongos controle ou infectados com *T. cruzi*, ao 15° dia de infecção, utilizando-se kit comercial (Bioclin). Os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante, brevemente descrito a seguir. As amostras foram incubadas com o substrato a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado o “reagente de cor” e a mistura deixada em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. Por fim, foi acrescentado hidróxido de sódio 0,4N e pipetado 200  $\mu$ L desta mistura em placas de 96 poços para leitura à 540 nm em leitor de placas (Multiskan, Thermo). Uma curva de calibração para cada transaminase foi gerada e lida juntamente com as amostras para o cálculo da concentração, fornecida em Unidades por mililitro (U/mL).

#### 4.16 Histopatologia

As análises histopatológicas foram realizadas no coração e o fígado obtidos no 15° dpi. Cada órgão (coração inteiro e lobo esquerdo do fígado) foi fixado em paraformaldeído 4% tamponado e processado, como previamente descrito (Arantes e Nogueira, 1997). Cortes semiconsecutivos de 5 $\mu$ m de espessura foram coradas com H&E. Análises qualitativas foram realizadas no tecido cardíaco. No fígado, foi feita quantificação do infiltrado inflamatório em fotomicrografias registradas em objetiva de 10x, analisando-se 20 campos escolhidos aleatoriamente em um corte, com uma área de

316,629  $\mu\text{m}^2$  analisada por campo. As imagens foram capturadas com o auxílio da microcâmara CoolSNAP-Pro (Media Cybernetics, Bethesda, MD) e analisadas no software KS300 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Um modelador automático de macros (um algoritmo do software KS300) foi elaborado para processamento de imagens e definição de condições morfométricas para determinação da celularidade hepática, expresso como área de núcleos por área de tecido.

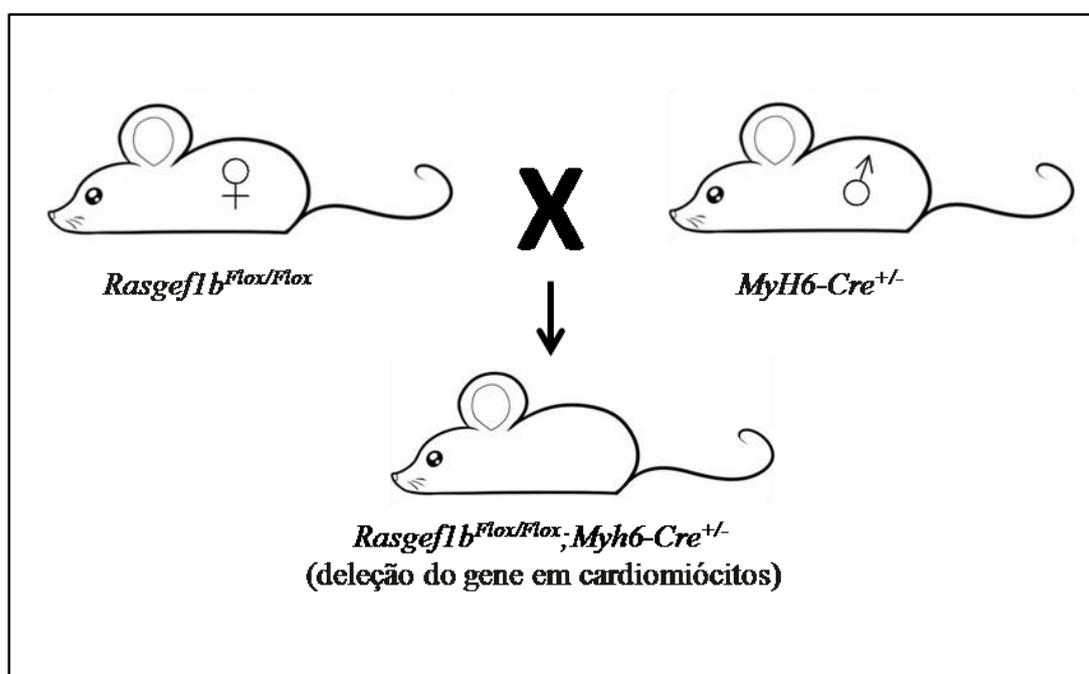
#### 4.17 Parasitismo tecidual

A carga parasitária tecidual no coração e no fígado foi quantificada por meio de PCR em tempo real, como descrito por (Cummings e Tarleton, 2003). O coração inteiro ou 100 mg do fígado provenientes de animais infectados foram macerados em 1 mL de PBS utilizando um homogeneizador de tecidos (OmniTissue Master, OmniInternational). Após dois ciclos de congelamento instantâneo e descongelamento, o homogenato foi centrifugado a 850 x g durante 5 minutos e 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante utilizado para extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (PCI). Ao final da extração o DNA foi solubilizado em água milli-Q e quantificado em espectrofotômetro NanoDrop lite (Thermo Scientific, EUA).

Utilizando 50 ng de DNA total, a PCR em tempo real foi realizada no sistema de detecção em tempo real CFX96 Touch™ (BioRad) usando o iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad) de acordo com as recomendações do fabricante. A equivalência do DNA do hospedeiro nas amostras foi confirmada pela medição dos níveis do produto de *11S* genômico nas mesmas amostras. O DNA de *T. cruzi*, obtido pelo método de PCI (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, 25:24:1), foi utilizado para construir uma curva de calibração com concentrações de DNA que variaram de 100 a 0,001 ng diluídos em solução aquosa para geração de curva e contendo quantidades equivalentes de DNA de tecido de camundongo não infectado. Os iniciadores utilizados, bem como as condições termocíclicas encontram-se na tabela 1.

#### 4.18 Geração de camundongos com deleção gênica condicional de *Rasgef1b* em cardiomiócitos

Camundongos com deleção condicional cardíaca de *Rasgef1b* foram gerados pelo sistema *Cre-loxP* (Hall *et al.*, 2009). Para isso, camundongos *Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>* fêmeas foram cruzadas com camundongos B6.FVB-Tg (*Myh6-Cre*) 2182Mds/J machos (background C57BL/6) (Agah *et al.*, 1997). As ninhadas obtidas foram genotipadas por meio de PCR de DNA genômico de cauda para seleção dos animais nocautes condicionais cardíacos, *Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>;Myh6Cre<sup>+/-</sup>* [abreviados RasGEF1b(Cm)-KO] (iniciadores descritos na Tabela 1).



**Figura 4.** Esquema de cruzamentos para geração de camundongos nocautes condicionais de RasGEF1b em cardiomiócitos. Os cruzamentos foram feitos preferencialmente utilizando camundongos fêmeas *Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>* e machos *Myh6-Cre<sup>+/-</sup>*.

#### 4.19 Isolamento de cardiomiócitos murinos e RT-qPCR

Miócitos cardíacos de camundongos adultos foram isolados de acordo com metodologia previamente descrita (Guatimosim *et al.*, 2001). Brevemente, animais C57BL/6 (WT) e RasGEF1b(Cm)-KO foram administrados com 100 U de heparina (Cristalina, Brasil) 15 minutos antes da eutanásia induzida altas doses de solução de quetamina (80 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg). Após a perfusão, os corações foram

tritutados em pedaços de 1 mm e agitado em solução contendo 50 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,7 mg/mL de collagenase e 0,02 mg/mL de protease. As células foram filtradas em uma tela de 200 µm para remover os fragmentos remanescentes, tendo a concentração de Ca<sup>2+</sup> extracelular aumentada gradualmente para 0,5 mM.

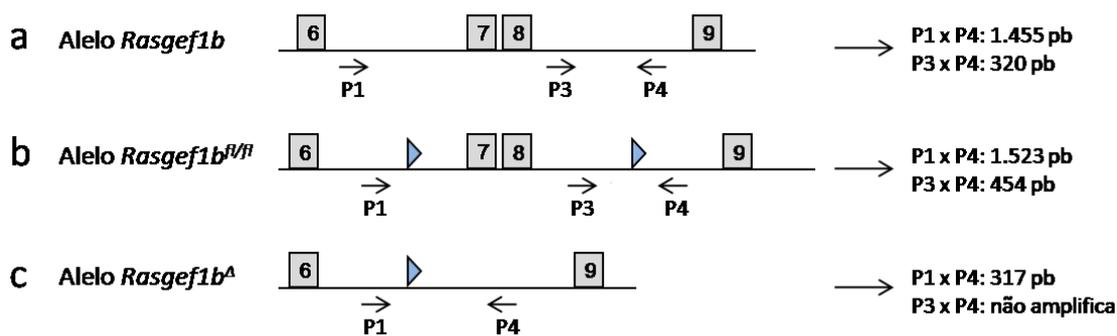
Ao final, a suspensão de células foi centrifugada por 1 minuto, 30 x g, e o sedimento suspenso em 1 mL de Trizol para obtenção de RNA e síntese de cDNA, como anteriormente descrito. As amostras foram submetidas a análises por QPCR para os seguintes alvos: *Rasgef1a*, *Rasgef1b*, *Rasgef1c*, *Ccl2*, *Il6*, *Nos2* e *Tnf*, utilizando o *Rpl32* como gene referência. As sequências dos iniciadores e condições termocíclicas encontram-se na tabela 2.

## 4.20 Oligonucleotídeos

Nas tabelas abaixo estão descritos todos os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

**Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para genotipagem, teste de *Mycoplasma* e RT-qPCR para parasitismo tecidual.**

Gene alvo Tipo de PCR	Iniciadores	Sequência 5' → 3'	Condições termocíclicas
<i>Rasgef1b</i> PCR - genotipagem	P1 } P3 } FWD	CCAAGAGCAGAGTGAACATGC GTATTGGGCAGCATGTATGTC	94°C/2 min. 94°C/30 s. 55°C/30s. } 30 ciclos 72°C/3 min.
	P4 REV	AGGTGTGTAATGGCCACTGAG	
<i>MyH6-Cre</i> PCR - genotipagem	Cre 1 FWD	GTCCAATTTACTGACCGTACACC	72°C/2m.15s. 72°C/3 min.
	Cre 2 REV	GTTATTCGGATCATCAGCTACACC	
<i>Mycoplasma</i> PCR	MGSO	TGCACCATCTGTCACCTCTGTTAACCTC	94°C/5 min. 94°C/30s. } 35 ciclos 55°C/30s. 72°C/30s.
	GPO4	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCT	
<i>H10</i> DNA genômico Parasitismo	QRT-mH10 FWD	GTAGAGGTGGACTGGACTCC	95°C/10 min. 95°C/15 seg. } 40 ciclos 60°C/30seg. 72°C/30seg.
	qRT-mH10 REV	CAGATGTGAGTGGCTCAGAG	
<i>T. cruzi</i> DNA genômico Parasitismo	TCZ FWD	GCTCTGCCACACGGGTGC	72°C/30seg. 72°C/30seg.
	TCZ REV	CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG	



**Figura 5. Esquema da localização dos primers utilizados na genotipagem dos camundongos RasGEF1b-KO's. (Adaptado de Silva et al., manuscrito em preparação). a)**

Representação da região do DNA correspondente ao alelo selvagem de *Rasgef1b*, mostrando apenas os exons 6, 7, 8 e 9 e as regiões intrônicas (-). b) A região que compreende os exons 7 e 8 foi o alvo selecionado para o flanqueamento pelos sítios loxP (triângulo azul). O alelo no qual houve o flanqueamento é denominado *Rasgef1b<sup>fl</sup>*. c) A recombinação pela recombinase Cre gerou a remoção da região de *Rasgef1b* flanquada, restando na sequência apenas um sítio loxP. O alelo gerado após a recombinação é denominado *Rasgef1b<sup>Δ</sup>*.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados nas análises de RT-qPCR.

Gene alvo	Iniciadores	Sequência 5' → 3'	Condições termocíclicas
<i>Ccl2</i>	qRT-mCcl2 FWD	TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA	
	qRT-mCcl2 REV	GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT	
<i>Cxcl10</i>	qRT-mCxcl10 FWD	CCAAGTGCTGCCGTCATTTTC	
	qRT-mCxcl10 REV	GGCTCGCAGGGATGATTTCAA	
<i>Ifng</i>	qRT-mIfng FWD	TCTGGAGGAACTGGCAAAAAG	
	qRT-mIfng REV	TTCAAGACTTCAAAGAGTCTGAGG	
<i>Il6</i>	qRT-mIl6 FWD	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	
	qRT-mIl6 REV	ACGACCAAATCCGTTGACTC	
<i>Irf1</i>	qRT-mIrf1 FWD	CCGAAGACCTTATGAAGCTCTTTG	
	qRT-mIrf1 REV	GCAAGTATCCCTTGCCATCG	
<i>Nos2</i>	qRT-mNos2 FWD	GCTTGCCCCAACAGGAGAAG	95°C/30 seg. 95°C/5 seg. 60°C/30seg. } 40 ciclos 65°C/31seg.
	qRT-mNos2 REV	GCTGCCCGGAAGGTTTGAC	
<i>Rasgef1a</i>	qRT-mRasgef1a FWD	GTCACCCGTTGTGGACAAAAG	65°C/5seg. } 60 ciclos +0,5°C/ciclo +0,5°C/1seg.
	qRT-mRasgef1a REV	TTGACCCGTTCCAGTTCAATG	
<i>Rasgef1b</i>	qRT-mRasgef1b_ex7-8 FWD 3	GCTACAGCGAACGGAAGAA	
	qRT-mRasgef1b_ex7-8 REV3	TTGACCCGTTCCAGTTCAATG	
<i>Rasgef1c</i>	qRT-mRasgef1c FWD	GCTGGAGCGACTAAGGCAC	
	qRT-mRasgef1c REV	CTGTTGAACCACTTCACGTAGG	
<i>Rpl32</i>	qRT-mRpl32 FWD	GCTGCCATCTGTTTTACGG	
	qRT-mIrf1 REV	TGACTGGTGCCTGATGAACT	
<i>Tnf</i>	qRT-mIrf1 FWD	ACAGAAAGCATGATCCGCG	
	qRT-mIrf1 REV	GCCCCCATCTTTTGGG	

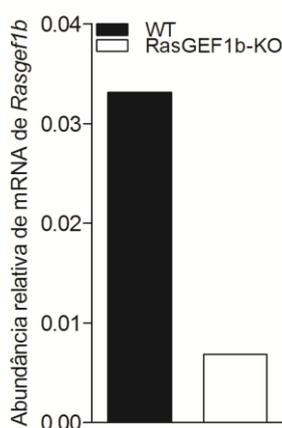
#### 4.21 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. O teste *t-student* foi aplicado para determinar significância estatística entre dois grupos. Análise de variância Two-way ANOVA, pós teste Bonferroni foi aplicada em análises agrupadas com mais de dois grupos. One-way ANOVA, pós teste Dunns foi aplicado para análises comparativas de mais de três grupos. As curvas de sobrevivência foram geradas pelo método de Kaplan-Meyer, sendo que a significância das diferenças calculada pelo teste de Log-Rank. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Todos os gráficos foram plotados no software *GraphPrism5.0*.

## 5. Resultados

### 5.1 RasGEF1b é dispensável para a internalização, multiplicação e liberação de *T. cruzi* em macrófagos

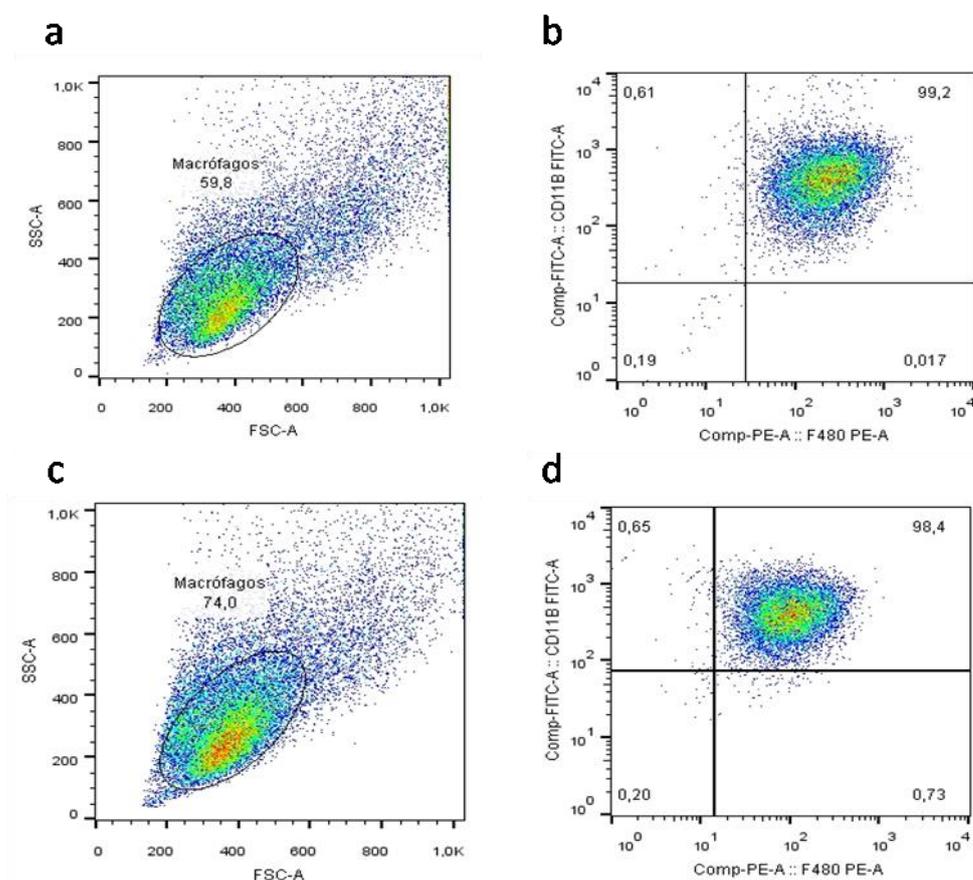
A fim de investigar se RasGEF1b desempenha papel em macrófagos infectados pelo *T. cruzi*, nós utilizamos inicialmente o modelo de infecção *in vitro* com macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs). Primeiramente foram analisados por qPCR os níveis de mRNA de *Rasgef1b* nas culturas de BMDMs obtidos de camundongos WT e RasGEF1b-KO ou RasGEF1b(Hc)-KO, a fim de determinar os níveis reduzidos do mRNA. Como observado na figura 6, os níveis de mRNA de *Rasgef1b* nas células selvagens são de 0,033, enquanto que nos BMDMs nocautes, esses níveis estão reduzidos em quase 5 vezes (0,007).



**Figura 6. Análise dos níveis de mRNA de Rasgef1b em BMDMs selvagens e nocautes de RasGEF1b.** Macrófagos derivados de medula óssea provenientes de camundongos WT ou RasGEF1b-KO foram diferenciados por 7 dias. Após a diferenciação foi obtido o RNA total, sintetizado o cDNA para análise dos níveis de mRNA de RasGEF1b por QPCR. A abundância relativa de mRNA foi calculada pelo método de Livak: ( $2^{-\Delta C_t}$ ). Os valores foram dados como média de duplicata técnica.

Para verificar a eficácia do protocolo de diferenciação das células de medula óssea em macrófagos, as células foram analisadas por citometria de fluxo onde os marcadores de superfície celular de macrófagos F4/80 e CD11b foram utilizados. As figuras 7a e 7b mostram os resultados das análises feitas em células WT. A partir do gráfico de tamanho e granulosidade (figura 7a) foi selecionada uma população

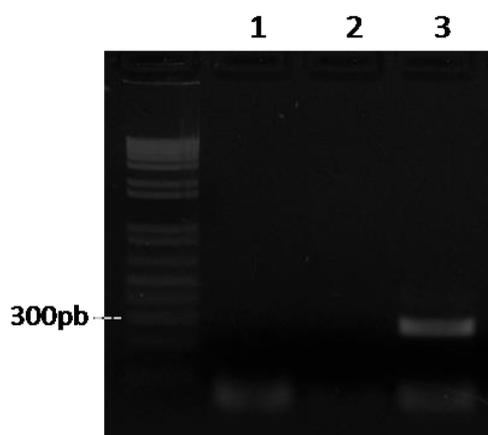
correspondente a 59,8% dos eventos capturados para análise da expressão dos marcadores de superfície. Das células selecionadas (Fig. 7b) 99,2% foram F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>. Em uma análise semelhante, células provenientes de animais deficientes de RasGEF1b apresentaram uma população de tamanho e granulosidade similar (Fig. 7c). A população selecionada (Fig. 7d) apresentou 98,4% de células duplo positivas para os marcadores F4/80<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup>. Deste modo, esta análise demonstra que BMDMs RasGEF1b-KO não apresentam alterações quanto a expressão dos marcadores de superfície F4/80 e CD11b quando comparados com os macrófagos WT.



**Figura 7. Expressão de moléculas de superfície F4/80 e CD11b em macrófagos derivados de medula óssea.** População de células provenientes da medula óssea de camundongos WT (a) ou RasGEF1b-KO (c) mostradas em uma representação biparamétrica com base no tamanho (eixo x: FSC, *forward scattered light*) e na granulosidade (eixo y: SSC, *side scattered light*). Os marcadores de superfície F4/80 (conjugado a FITC) e CD11b (conjugado a PE) foram analisados a partir do *gate* feito na região onde se observou maior concentração de células. Em

b e d estão representadas as população de células duplo positivas F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> de BMDMs WT e RasGEF1b-KO, respectivamente.

Nos estudos de infecção *in vitro* foram utilizadas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, cepa Y, que foram mantidas em cultura de células LLC-MK2. Além disso, o sobrenadante de cultura de células L929 foi utilizada no meio de diferenciação de BMDMs. A contaminação de cultura de células por bactérias intracelulares do gênero *Mycoplasma* é bastante comum (Drexler e Uphoff, 2002). Tendo em vista que moléculas derivadas deste microorganismo são capazes de ativar receptores da resposta imune, tais como TLR2 e TLR 4 (He *et al.*, 2009; Zuo *et al.*, 2009), ambos também ativados pelo *T. cruzi*, as culturas de LLC-MK2 e de parasitos foram periodicamente monitorados, para garantir a utilização de células livres de contaminação e evitar interpretações errôneas. Na figura 8 está representado o produto gerado após PCR com iniciadores específicos para *Mycoplasma*, após fracionamento em gel de agarose.



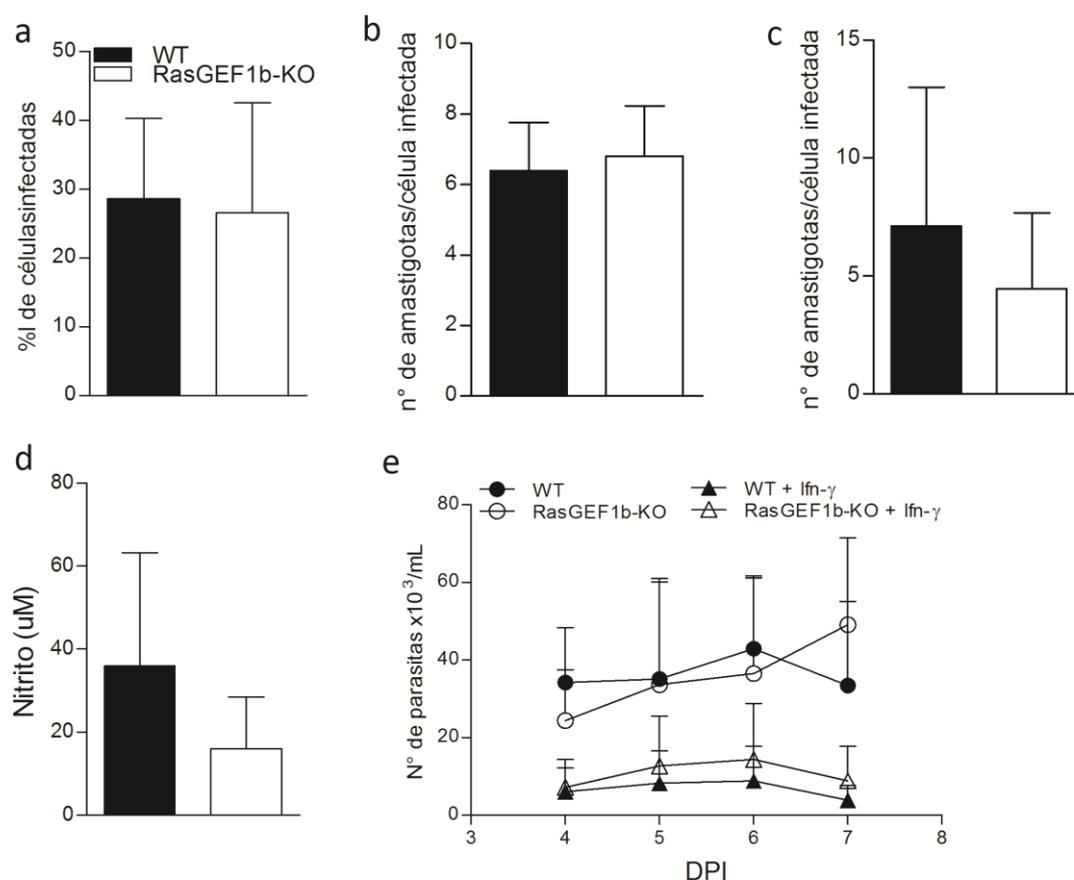
**Figura 8. Detecção de *Mycoplasma* sp. por PCR.** Suspensão de células ou parasitos em cultura foram lisados por fervura (100°C, 10 minutos) e utilizadas como molde para PCR convencional utilizando os iniciadores MGSO e GPO3. Os produtos da amplificação foram fracionados em gel de agarose (1,5%) contendo brometo de etídeo. Após fracionamento, o gel foi fotodocumentado em transluminador de luz ultravioleta para visualização das bandas. *Ladder*: 1Kb plusladder (Invitrogen); 1 – lisado de células LLC-MK2; 2 – lisado de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) de cultura; 3 – controle positivo obtido de células sabidamente contaminadas por *Mycoplasma* sp, com amplificação de uma banda de 270 pb.

Um dos principais mecanismos do hospedeiro para o controle da infecção pelo *T. cruzi* é a ativação de macrófagos, dada a sua capacidade em restringir a multiplicação e liberação de parasitos (Vespa et al., 1994; Bafica et al., 2006). Assim, experimentos de infecção em BMDMs derivados de camundongos WT e RasGEF1b-KO foram conduzidos para avaliar a internalização e multiplicação intracelular de amastigotas. Na figura 9a observa-se que o percentual de macrófagos WT infectados é igual a 28,6% ( $\pm$  EPM). Percentual semelhante (26.5%  $\pm$  EPM) foi observado nos macrófagos RasGEF1b-KO infectados com *T. cruzi*. Ademais, ao se avaliar o número de amastigotas nos macrófagos WT e KO infectados (figura 9b), observa-se que o número de parasitos intracelulares é similar nos dois genótipos (WT: 6  $\pm$  EPM; KO: 6  $\pm$  EPM).

Tendo em vista que a ativação de macrófagos por IFN- $\gamma$  é importante para geração de agentes tripanocidas intracelulares, tais como o óxido nítrico (NO) BMDMs selvagens e nocautes foram primados por 3 horas com rIfn- $\gamma$  e em seguida infectados com *T. cruzi*. Após 48 horas de infecção, o número de parasitos intracelulares assim como a concentração de nitrito foram determinados. O resultado (Fig 9c) indica que macrófagos deficientes de RasGEF1b que foram primados com o rIfn- $\gamma$  apresentaram moderado aumento na eficácia em restringir a multiplicação intracelular do *T. cruzi* (4,  $\pm$  EPM), quando comparado com as células WT (7  $\pm$  EPM), porém sem significância estatística. No entanto, a concentração de nitrito no sobrenadante de cultura de macrófagos RasGEF1b-KO infectados estava reduzida quando comparada com os WT (Fig. 9d), sugerindo que a relativa redução de parasitos intracelulares observada nos BMDMs KO's é independente da produção de NO.

Em seguida, analisamos a liberação de tripomastigotas no sobrenadante de cultura dos macrófagos infectados. Para isso, o número de tripomastigotas liberados no sobrenadante foi determinado no intervalo de quatro a sete dias após a infecção em macrófagos WT e RasGEF1b-KO. Paralelamente, também avaliamos a capacidade tripanocida dos macrófagos que foram ativados por Ifn- $\gamma$  após a infecção. O resultado mostra que tanto na ausência quanto na presença de Ifn- $\gamma$ , os macrófagos desprovidos de RasGEF1b liberaram quantidades semelhantes de tripomastigotas comparados aos macrófagos WT (Fig. 9e)

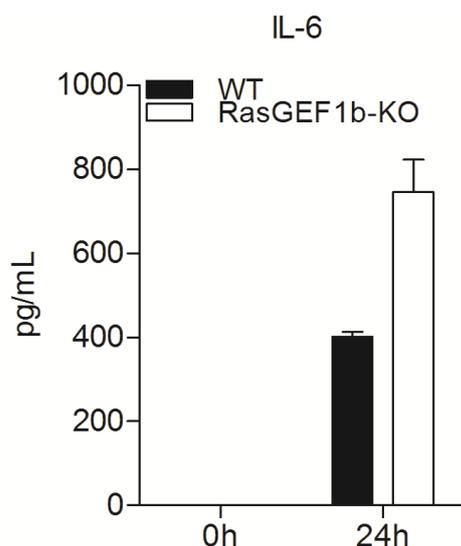
Em conjunto, esses resultados sugerem que RasGEF1b é dispensável para os processos de internalização de tripomastigotas, multiplicação intracelular de amastigotas assim como na liberação de parasitos durante a infecção em BMDMs.



**Figura 9. Taxa de infecção, multiplicação intracelular, liberação de tripomastigotas e produção de NO por BMDMs WT e RasGEF1b-KO durante a infecção por *T. cruzi*.** BMDMs de animais WT e RasGEF1b-KO foram infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* (MOI 5:1). Para avaliar o percentual de infecção (a), os BMDMs foram plaqueados sobre lamínulas, infectados e após 4h foram fixados e corados por Panótico Rápido. A contagem do número de amastigotas por célula infectada foi feita 48h após a infecção em BMDMs não tratados (b) ou tratados com  $\text{Ifn-}\gamma$  (c). Nas contagens, foram analisadas 300 células em campos aleatórios e em triplicata. (d) BMDMs foram primados com  $\text{rIfn-}\gamma$  (50U/mL) por 3h, infectados e após 48h o sobrenadante foi coletado para dosagem de NO pelo método Griess. (e) O número de tripomastigotas no sobrenadante de BMDMs infectados, tratados ou não com  $\text{IFN-}\gamma$  (100 ng/mL), foi determinado do 4° ao 7° dpi. Os valores são dados como média  $\pm$  erro padrão da média de dois experimentos independentes, feitos em triplicata técnica.

## 5.2 BMDMs deficientes de RasGEF1b infectados com *T. cruzi* produzem mais IL-6

Durante infecção por *T. cruzi* macrófagos são ativados e produzem diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 (Nathan, 1987). Para verificar se RasGEF1b está envolvido na produção desta citocina, BMDMs derivados de camundongos WT e RasGEF1b-KO foram infectados com *T. cruzi* ou não (controle) e o sobrenadante da cultura obtido após 24h para quantificação de IL-6. Como esperado, os BMDMs não infectados não produziram IL-6 (Fig. 10). Após 24 horas foi observado um aumento na concentração de IL-6 no sobrenadante de células WT e RasGEF1b-KO. No entanto, BMDMs deficientes de RasGEF1b produziram quantidades maiores de IL-6 ( $746 \text{ pg/mL} \pm \text{DP}$ ), quando comparados com células selvagens ( $402 \pm \text{DP}$ ).



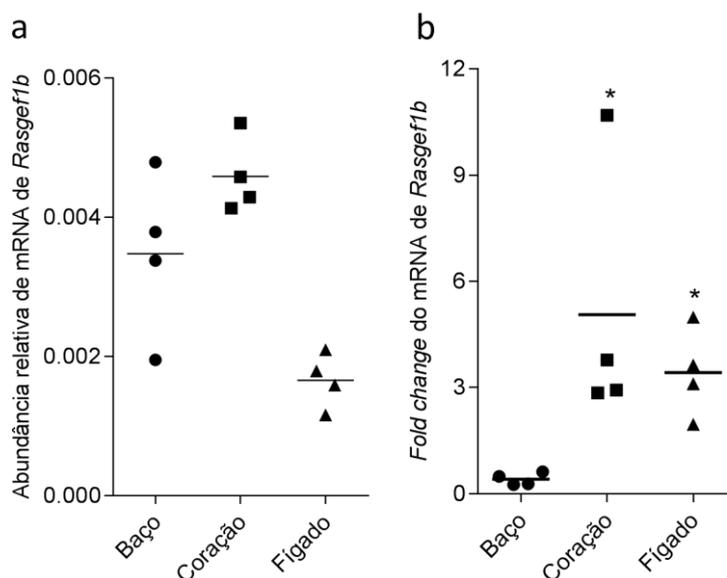
**Figura 10. Análise da concentração de IL-6 no sobrenadante de cultura de BMDMs infectados com *T. cruzi*.** BMDMs provenientes de animais WT e RasGEF1b-KO foram infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* (MOI 5:1) e o sobrenadante de cultura obtido após 24h para quantificação de IL-6 por ELISA. Sobrenadante de células não infectadas foi usado com controle (0h). Os valores são dados como média  $\pm$  desvio padrão de triplicata técnica. Resultado representativo de um experimento.

### 5.3 A expressão de RasGEF1b é induzida no coração e fígado, mas não no baço de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi*

A expressão de RasGEF1b em tecidos de camundongos infectados com *T. cruzi* já havia sido demonstrado anteriormente por meio de análises de northernblot (Ferreira et al., 2002) e RT-PCR (Andrade et al., 2010). Ambas as técnicas utilizadas são capazes de revelar a presença do transcrito sem, no entanto, fornecer evidências dos níveis do mRNA. Além disso, nesses estudos foram utilizadas as linhagens CL Brener e Colombiana de *T. cruzi*, respectivamente.

Inicialmente, determinamos por RT-qPCR os níveis basais do mRNA de *Rasgef1b* no baço, coração e fígado de camundongos C57BL/6 (selvagem ou *wild type*, WT) não infectados. No resultado obtido (Figura 11a) observa-se a abundância relativa do mRNA de *Rasgef1b* em relação ao gene referência *Rpl32*. Os níveis basais do transcrito são semelhantes no baço e no coração, enquanto que no fígado os níveis do mRNA são cerca de 2 vezes menores do que nos outros dois tecidos.

Para investigar os níveis de mRNA de *Rasgef1b* no baço, coração e fígado após infecção por *T. cruzi*, camundongos selvagens foram infectados com a cepa Y e, após sacrifício dos animais, os órgãos foram coletados após 15 dias de infecção. A expressão de *Rasgef1b* foi induzida no coração e no fígado dos animais infectados 15 dpi, chegando a um *fold* de indução de aproximadamente 3 vezes e 4 vezes, respectivamente (Fig. 11b). Por outro lado, não foram observados níveis aumentados do mRNA de *Rasgef1b* no baço dos animais infectados. Embora haja uma redução dos níveis do mRNA neste órgão, a diferença não é significativa estatisticamente em relação ao basal.



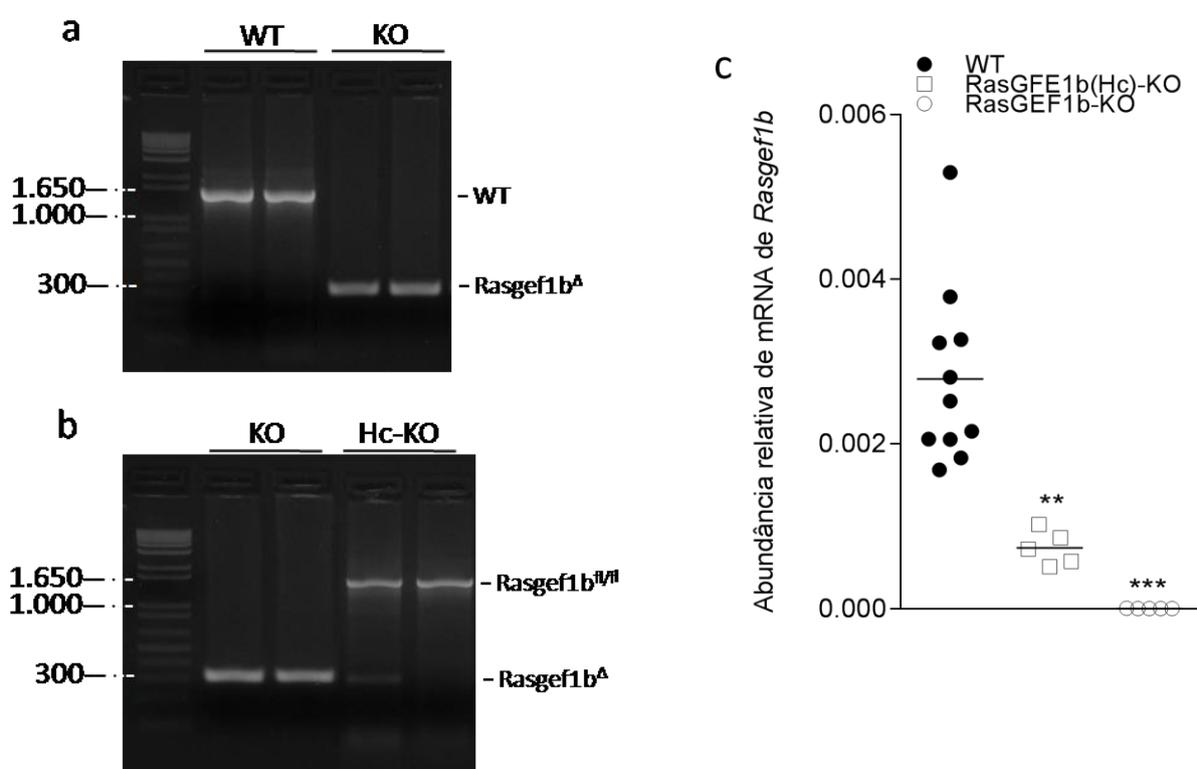
**Figura 11. Análise dos níveis do mRNA de RasGEF1b no baço, coração e fígado de camundongos C57BL/6 após infecção com *T. cruzi*.** Camundongos C57BL/6 (WT) foram infectados (i.p.) com 100 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) ou administrados i.p. com 100  $\mu$ L de PBS. Nos dias 10 e 15 pós-infecção os animais foram eutanasiados e os órgãos retirados para extração de RNA total, síntese de cDNA e análise de níveis de mRNA de RasGEF1b, em relação ao gene referência *Rpl32*. (a) A abundância relativa de mRNA foi calculada pelo método de Livak: ( $2^{-\Delta Ct}$ ). (b) *Fold change* foi calculado para cada órgão separadamente, com base nos valores de abundância relativa de mRNA de RasGEF1b de animais tratados com PBS (calibrador). Valores obtidos pelo método de Livak ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Os valores foram dados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4). Valores significativamente diferentes comparados com o basal (\* $p < 0,05$ ), teste t.

#### 5.4 Sobrevida e parasitemia em camundongos deficientes de RasGEF1b

Uma vez determinada que a expressão de RasGEF1b é aumentada durante a fase aguda da infecção *in vivo* pela cepa Y de *T. cruzi*, fomos então investigar se RasGEF1b desempenha função *in vivo* na resposta imune inata ao protozoário. Para tanto, utilizamos camundongos com deleção ubíqua, *Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>;CMV-Cre* (a partir de agora denominado RasGEF1b-KO), ou com deleção gênica condicional de RasGEF1b no sistema hematopoiético, *Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>;Vav-iCre* (de agora em diante referido como RasGEF1b(Hc)-KO).

Em todos os experimentos foram monitorados os genótipos dos animais por meio da análise do DNA genômico de cauda por PCR. Para isto, foi utilizado o par de

iniciadores P1xP4, que pareiam respectivamente a montante e a jusante da região alvo da recombinação (mais detalhes no esquema da figura 5). Na figura 12a observam-se fragmentos amplificados a partir do DNA de animais WT (1.466 pb) e de animais RasGEF1b-KO (317 pb). Na figura 12b, observam-se os fragmentos amplificados a partir do DNA de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO. Nestes animais, uma vez que a recombinação não ocorre em todos os tecidos, podem ser observados fragmentos de 1.534 pb e/ou fragmentos de 317 pb.



**Figura 12. Genotipagem dos camundongos RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO por PCR e análise dos níveis de mRNA no baço.** O DNA genômico da cauda de camundongos WT, RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO foi extraído, amplificado por PCR e os produtos de amplificação fracionados em gel de agarose (1,5%) contendo brometo de etídeo. Após fracionamento, o gel foi fotodocumentado em transluminador de luz ultravioleta. As bandas observadas no gel são correspondentes aos fragmentos amplificados pelos iniciadores P1 e P4. (a) *Ladder*: 1Kb plus ladder (Invitrogen); WT: fragmento de 1.466 pb (alelo *Rasgef1b*); KO: fragmento de 317 pb (alelo *Rasgef1b<sup>Δ</sup>*). (b) *Ladder*; Hc-KO: fragmentos de 1.523 pb (alelo *Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>*, nas duas canaletas) e 317 pb (*Rasgef1b<sup>Δ</sup>*, na primeira canaleta). (c) Baços obtidos

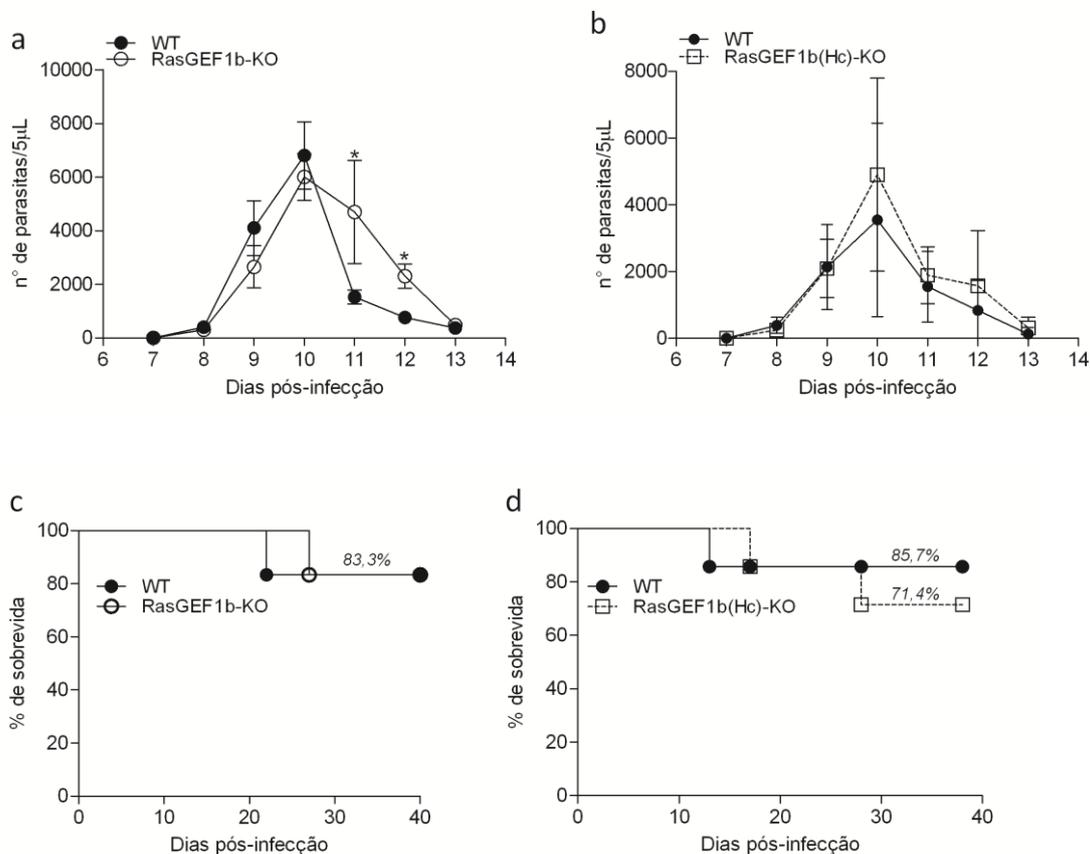
das três linhagens (WT, RasGEF1b(Hc)-KO e RasGEF1b-KO) foram coletados. Extração de RNA total e síntese de cDNA foi conduzida para análise dos níveis de mRNA de RasGEF1b, em relação ao gene referência *Rpl32*. A abundância relativa de mRNA foi calculada pelo método de Livak: ( $2^{-\Delta C_t}$ ). Os valores foram dados como média  $\pm$  desvio padrão (n =5). Valores significativamente diferentes comparados com WT (\*\*p < 0,005; \*\*\*p < 0,001), teste t.

Sendo que o baço é um órgão linfóide constituído predominantemente por células de origem hematopoiéticas (Mebius e Kraal, 2005), resolvemos analisar os níveis de mRNA de RasGEF1b nesse tecido, como uma forma de inferir o percentual de deleção obtido nos diferentes nocautes para este alvo. Para tanto, os níveis basais de mRNA no baço de camundongos WT, RasGEF1b(Hc)-KO e RasGEF1b-KO foram quantificados por QPCR. Os níveis basais do mRNA de RasGEF1b (Fig. 12c) foram semelhantes aos já anteriormente analisados (Fig. 11a), com valor médio de 0,0028 ( $\pm$  DP). Nos camundongos nocautes os valores foram significativamente reduzidos, como mostrado no gráfico da figura 12c. Em relação ao percentual de deleção comparados aos níveis basais de WT, nos camundongos RasGEF1b(Hc)-KO houve uma redução de 73% nos níveis de mRNA de RasGEF1b no baço (Fig. 12c), enquanto que animais RasGEF1b-KO apresentaram 99,9%, como esperado.

Iniciando os estudos de infecção *in vivo*, animais WT, RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO foram infectados com 100 formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* e a parasitemia monitorada do 7º ao 13º dia pós-infecção. Conforme pode ser observado na figura 13, os resultados indicam que não há diferenças no início da parasitemia entre os camundongos KO's quando comparados aos camundongos WT. Ainda, é possível notar que o pico de parasitemia ocorreu no décimo dia pós-infecção para todos os grupos analisados, ou seja, foi semelhante entre camundongos nocautes e WT (Fig. 13a e b). No entanto, nos dias 11 e 12 após a infecção foi observado que o número de parasitos no sangue era elevado em até 3 vezes nos animais RasGEF1b-KO, porém retornando a números similares aos de camundongos WT no 13º dpi (Fig. 13a). O perfil de parasitemia dos camundongos nocautes condicionais hematopoiéticos RasGEF1b(Hc)-KO foi similar ao dos animais WT em todo o intervalo de 7 a 13 dias pós-infecção (Fig. 13b).

Na figura 13c observa-se que a sobrevivência de animais RasGEF1b-KO é similar à do grupo dos camundongos WT. Já os camundongos RasGEF1b(Hc)-KO (Fig. 13d), a

sobrevida é reduzida (71,4%) em relação a de animais WT (85,7%), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa.



**Figura 13. Análise da sobrevivida e parasitemia em camundongos RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO infectados com *T. cruzi*.** Camundongos WT, RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO foram infectados com 100 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e acompanhadas a parasitemia do 7° ao 13° dpi (a e b) e a sobrevivida e diariamente até 40° dpi (c e d). Resultados representativos de dois experimentos independentes. Os valores foram dados como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 5$  em a, b e c;  $n = 7$  em d. Valores significativamente diferentes comparados com WT (\* $p < 0,05$ ), teste t.

### 5.5 A concentração de IFN- $\gamma$ e IL-6 encontra-se elevada no soro de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO infectados com *T. cruzi*

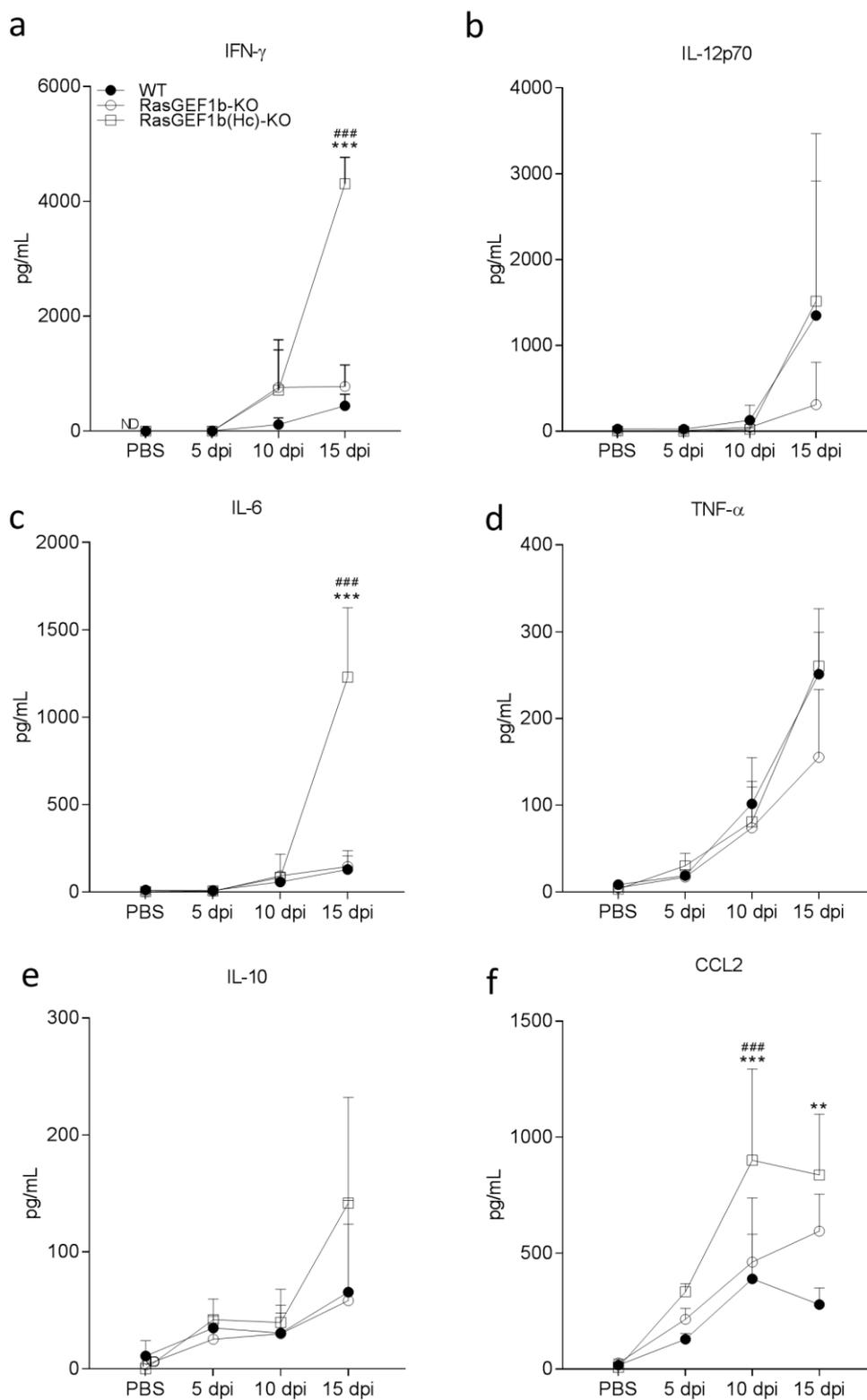
Para investigar se RasGEF1b desempenha função na produção de citocinas e quimiocinas críticas na fase aguda da infecção por *T. cruzi*, animais WT, RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO foram tratados com PBS ou infectados com *T. cruzi*. Inicialmente, avaliamos a produção dos mediadores inflamatórios em diferentes intervalos de dias pós-infecção, a saber 5, 10 e 15 dias. Assim, o soro foi coletado para determinar a concentração das citocinas pró-inflamatórias Ifn- $\gamma$ , Il-12p70, Il-6 e Tnf, da citocina anti-inflamatória Il-10 e da quimiocina Ccl2, todos pelo método de CBA.

Como esperado, a concentração de todos os mediadores inflamatórios avaliados estavam muito reduzida (Fig. 14b-f) ou não detectada (Fig. 14a) no soro dos animais tratados com PBS. Ao 5° dpi, a concentração de Ifn- $\gamma$ , Il-12p70 e Il-6, tanto no soro dos animais selvagens quanto no dos nocautes, encontrava-se em níveis próximos aos dos animais tratados com PBS (Fig. 14a, b, c). Em relação aos respectivos animais controle de cada genótipo, no 5° dia pós-infecção a concentração de Il-10 foi aumentada nos grupos WT e RasGEF1b-KO, enquanto que nos camundongos RasGEF1b(Hc)-KO, começou a ser detectada concentrações próximas aos dos outros dois grupos (Fig. 14e). Os níveis de Tnf (Fig. 14d) e Ccl2 (Fig. 14f) também se encontravam mais elevados nos animais WT, RasGEF1b-KO ou RasGEF1b(Hc)-KO infectados após 5 dias, em relação aos respectivos grupos PBS.

No 10° dpi, momento no qual é observado o pico da parasitemia (Fig. 14a, b), a concentração de Ifn- $\gamma$  (Fig. 14a), Il-12p70 (Fig. 14b), Il-6 (Fig. 14c) e Tnf (Fig. 14d) no soro dos camundongos WT, RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO era aumentada em relação aos respectivos grupos PBS. Ainda, a concentração dessas citocinas estava mais elevada do que no 5° dpi, sem, no entanto, haver diferença estatística entre os grupos. A quantidade da citocina Il-10 detectada no soro após 10 dias de infecção se encontrava em níveis semelhantes ao do 5° dpi (Fig. 14e). Interessantemente, a concentração da quimiocina Ccl2 foi encontrada mais elevada no soro de animais RasGEF1b(Hc)-KO quando comparado ao grupo RasGEF1b-KO, que apresentaram níveis semelhantes aos animais selvagens (Fig. 14f).

Quando foi analisada a produção dos mediadores inflamatórios no soro dos camundongos aos quinze dias após a infecção, foi observado que a concentração de Il-

12p70 era similar entre os grupos WT, RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO (Fig. 14b), sem diferenças estatisticamente significativas. Analogia semelhante pôde ser feita para as citocinas Il-10 e Tnf (Fig. 14e, d). Entretanto, diferenças significativas foram encontradas na produção de Ifn- $\gamma$  e Il-6 entre os grupos de camundongos selvagens e os nocautes condicionais.



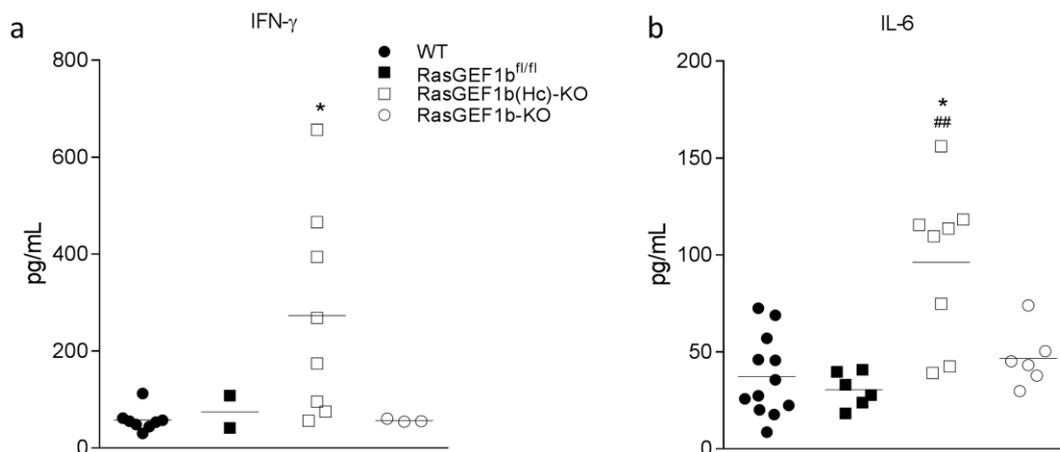
**Figura 14. Produção de citocinas no soro de camundongos C57BL/6, RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO infectados com *T. cruzi*.** Camundongos WT, RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO foram administrados i.p. com 100 $\mu$ L de PBS ou 100 formas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y (Tc). O soro foi coletado após 5, 10 e 15 dias de infecção para dosagem de Ifn-

$\gamma$  (a), Il-12p70 (b), Il-10 (c), Il-6 (d), Tnf (e) e Ccl2 (f) por citometria de fluxo (Mouse Inflammation kit, CBA, BD). Resultados representativos de dois experimentos independentes, exceto para Ccl2. Os valores foram dados como média  $\pm$  desvio padrão, n=4. Valores significativamente diferentes comparados com WT (\*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001) ou comparados com RasGEF1b(Hc)-KO (#p < 0,05; ###p < 0,001). Two-way ANOVA, Bonferroni post-test.

Enquanto que a concentração no soro dos camundongos WT era de 129,4 pg/mL (média  $\pm$  DP) para Il-6 e 441,4 ng/mL (média  $\pm$  DP) para Ifn- $\gamma$ , valores próximos ou sem uma significância estatística aos dos camundongos RasGEF1b-KO, ou seja, 145,3 ng/mL para Il-6 (média  $\pm$  DP) e 780,1 ng/mL (média  $\pm$  DP) de Ifn- $\gamma$ , os camundongos RasGEF1b(Hc)-KO produziram níveis muito elevados dessas citocinas: 4.307,3 ng/mL de Ifn- $\gamma$  e 1.228,5 ng/mL de IL-6 (Fig. 14a, c). Ademais, a concentração de Ccl2 estava elevada no soro de camundongos RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO quando comparados com WT. No entanto, ao se comparar os KO's com o WT, diferença estatística foi encontrada apenas para o grupo dos camundongos RasGEF1b(Hc)-KO (Fig. 14f).

Considerando que os animais RasGEF1b(Hc)-KO apresentam a deleção de *Rasgef1b* apenas em células de origem hematopoiéticas e que o gene, nos demais tecidos desses animais, encontra-se flanqueado por sítios loxP, nós nos perguntamos se o efeito observado na produção de Ifn- $\gamma$  e Il-6 poderia resultar da contribuição do flanqueamento do gene. Assim, experimentos foram conduzidos com animais WT e RasGEF1b(Hc)-KO ou com RasGEF1b<sup>fl/fl</sup> e RasGEF1b-KO, que foram infectados e a concentração destas citocinas analisada no soro obtido no 15º dia pós-infecção. Na figura 15a é possível observar que os níveis séricos de Ifn- $\gamma$  são semelhantes nos animais WT (57,9 pg/mL  $\pm$  DP) e RasGEF1b<sup>fl/fl</sup> (74,6 pg/mL  $\pm$  DP). Como esperado, nos camundongos RasGEF1b(Hc)-KO a concentração foi significativamente maior (96,2 pg/mL  $\pm$  DP) quando comparada aos animais WT. Ainda, corroborando o com o que foi observado na figura 14a, não houve diferença significativa na produção de Ifn- $\gamma$  por camundongos nocautes totais (56,8 pg/mL  $\pm$  DP), quando comparados ao grupo selvagem (Fig. 15a). O mesmo pôde ser verificado para produção de Il-6 (Fig. 15b), onde as concentrações foram semelhantes nos grupos WT (37,3 pg/mL  $\pm$  DP), RasGEF1b<sup>fl/fl</sup> (30,6 pg/mL  $\pm$  DP) e RasGEF1b-KO (46,7 pg/mL  $\pm$  DP). A concentração de Il-6 no soro dos animais RasGEF1b(Hc)-KO (273,3 pg/mL  $\pm$  DP) foi significativamente mais elevada quando comparada com WT ou com RasGEF1b<sup>fl/fl</sup>.

Estes resultados sugerem que não há um efeito do flanqueamento de *Rasgef1b* na produção das citocinas Ifn- $\gamma$  e Il-6.



**Figura 15. Análise da concentração de Ifn- $\gamma$  e Il-6 no soro de camundongos WT, RasGEF1b<sup>fl/fl</sup>, RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO infectados com *T. cruzi*.** A infecção dos camundongos foi realizada como descrita na figura 7. Quinze dias pós-infecção, o soro foi obtido e as citocinas Ifn- $\gamma$  (a) e Il-6 (b) quantificadas por ELISA. Valores dados como média  $\pm$  desvio padrão; n=8 (WT); n=6 (RasGEF1b<sup>fl/fl</sup>); n= 8 [Rasgef1b(Hc)-KO]; n=5 (RasGEF1b-KO). Os valores foram considerados significativamente diferentes comparados com WT (\*p < 0,05) ou RasGEF1b<sup>fl/fl</sup> (##p < 0,01), One-way ANOVA, Dunns post-test.

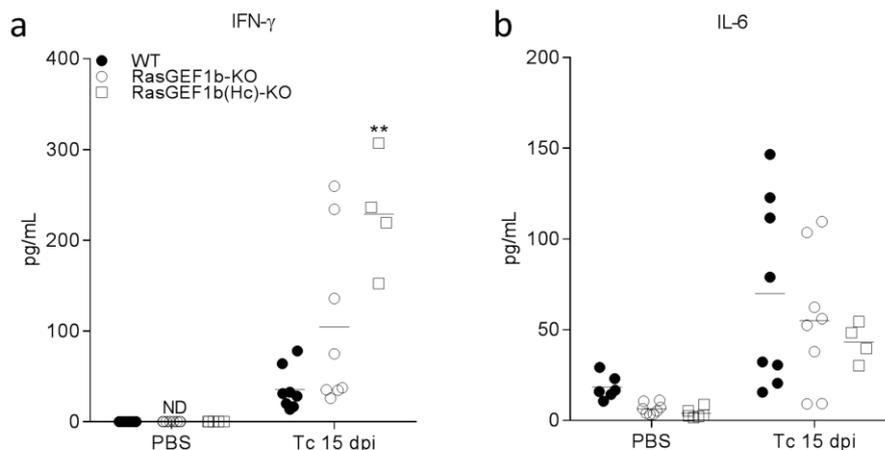
### 5.6 Elevada produção de Ifn- $\gamma$ por esplenócitos de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO infectados com *T. cruzi*

Uma vez que foram observadas diferenças na produção de Ifn- $\gamma$  e Il-6 no soro de animais nocautes condicionais para RasGEF1b comparados aos WT, nosso próximo passo foi avaliar a produção *ex vivo* desses mediadores em cultura de esplenócitos. Para isso, camundongos WT, RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO foram infectados com 100 formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, tendo os esplenócitos obtidos no 15<sup>o</sup> dpi, cultivados por 48 horas e, finalmente, o sobrenadante coletado para quantificação das citocinas por CBA.

Como esperado, os níveis de Ifn- $\gamma$  no sobrenadante da cultura de esplenócitos provenientes de animais administrados com PBS não foram detectados (Fig. 16a). Ao se avaliar a produção no 15<sup>o</sup> dpi (Fig. 16a), as células derivadas de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO produziram quantidades significativamente maiores de Ifn- $\gamma$  (228,7

ng/mL  $\pm$  DP), quando comparado aos animais WT (35,5 ng/mL  $\pm$  DP), corroborando com a maior produção observada no soro (Fig. 16a). Em relação aos animais RasGEF1b-KO comparados com WT, há uma maior tendência na produção de Ifn- $\gamma$  pelos esplenócitos nocautes (104,7 ng/mL  $\pm$  DP), porém não foram observadas diferenças estatísticas. Curiosamente, esplenócitos provenientes dos camundongos RasGEF1b(Hc)-KO foram mais eficientes na produção de Ifn- $\gamma$ , comparados aos derivados de animais RasGEF1b-KO, ainda que essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa (Fig. 16a).

Ao avaliar a produção de Il-6 pelos esplenócitos provenientes de animais tratados com PBS, foi detectada alguma produção, ainda que em baixas concentrações (Fig. 16b). Aparentemente há uma quantidade maior desta citocina no sobrenadante de esplenócitos selvagens (18,3 ng/mL  $\pm$  DP) em relação a média produzida pelas células nocautes (6,4 ng/mL e 3,8 ng/mL, nocaute total e condicional hematopoiético, respectivamente). No entanto, não houve diferença estatística entre os grupos. No 15º dia pós-infecção a mesma tendência foi observada entre esplenócitos provenientes de camundongos WT (69,8 ng/mL  $\pm$  DP), RasGEF1b-KO (55,0 ng/mL  $\pm$  DP) e RasGEF1b(Hc)-KO (43,1 ng/mL  $\pm$  DP) (Fig. 14b). Este resultado indica que a maior quantidade de Il-6 observada no soro dos animais RasGEF1b(Hc)-KO (Fig. 14d) não é proveniente de uma maior produção desta citocina por esplenócitos.



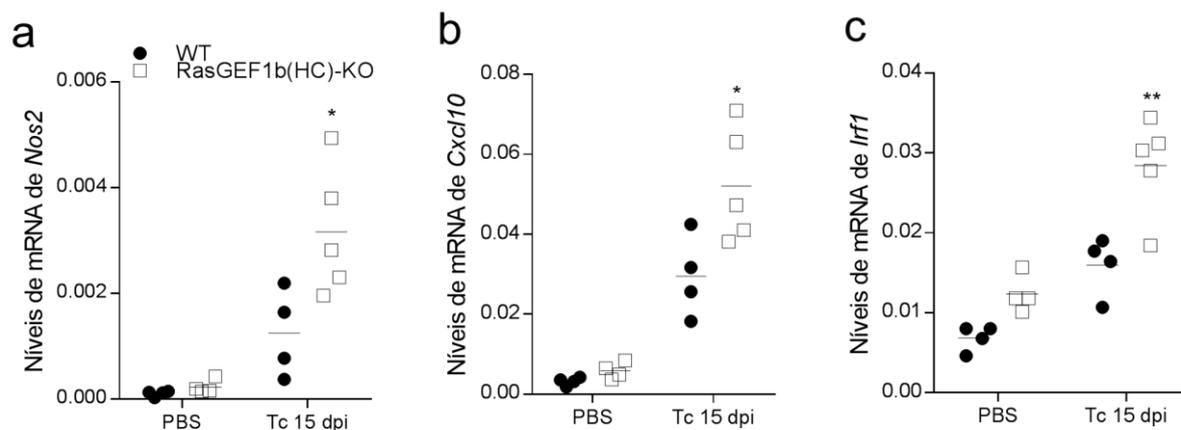
**Figura 16. Análise da concentração de *Ifn-γ* e *Il-6* no sobrenadante de cultura de esplenócitos provenientes de camundongos WT, RasGEF1b-KO e RasGEF1b(Hc)-KO infectados com *T. cruzi*.** A infecção de camundongos WT e Rasgef1b(Hc)-KO foi realizada como descrita na figura 7. Quinze dias pós-infecção, os baços foram removidos, processados e os esplenócitos mantidos em cultura por 48 horas. O sobrenadante foi coletado e as citocinas *Ifn-γ* (a) e *Il-6* (b) quantificadas por citometria de fluxo (*Mouse Inflammation kit*, CBA, BD). Valores dados como média  $\pm$  desvio padrão, n=8 (WT) e n=4 [Rasgef1b(Hc)-KO] e considerados significativamente diferentes comparados com WT (\*\*p < 0,01). Two-way ANOVA, Bonferroni post-test.

### 5.7 Os níveis de mRNA de genes induzidos por *Ifn-γ* encontram-se elevados no fígado de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO durante a infecção por *T. cruzi*

*Ifn-γ* é responsável pela regulação de vários genes essenciais na resposta imune durante a infecção pelo *T. cruzi* (Stahl et al., 2014). Uma vez que o fígado tem um importante papel protetor no contexto da infecção pelo *T. cruzi* e produz quantidades significativas de *Ifn-γ* (Sardinha et al., 2006), nós decidimos avaliar se a maior produção desta citocina por animais RasGEF1b(Hc)-KO implicou no aumento da expressão gênica de moléculas alvo de *Ifn-γ* como a enzima óxido nítrico sintase induzível (*Nos2*), a quimiocina *Cxcl10* (*Cxcl10*) e o fator de transcrição IRF1 (*Irf1*). Para tanto, fígado de animais WT e RasGEF1b(Hc)-KO tratados com PBS ou infectados com *T. cruzi* (15 dpi) foram coletados para análises de QPCR. Os níveis basais de mRNA de *Nos2* no fígado de animais WT e RasGEF1b(Hc)-KO foram semelhantes (cerca de  $0,0001 \pm$  DP) (Fig. 17a). Quando analisamos os níveis basais dos transcritos de *Cxcl10* (Fig. 17b) e

*Irf1* (Fig. 17c), os valores são, no mínimo, trinta vezes maiores do que os de *Nos2*. Entre os grupos selvagem e nocaute condicionais hematopoiéticos, há uma tendência de haver mais mRNA no fígado dos nocautes, porém não há significância estatística.

Analisando os níveis de mRNA nos tecidos infectados, observa-se consistentemente um aumento significativo na expressão dos três genes analisados em camundongos RasGEF1b(Hc)-KO comparando com o grupo WT, sendo o *fold* de indução de 2,2 vezes para *Nos2*, 1,9 vezes para *Cxcl10* e 1,6 vezes para *Irf1* (Fig. 17a-c).

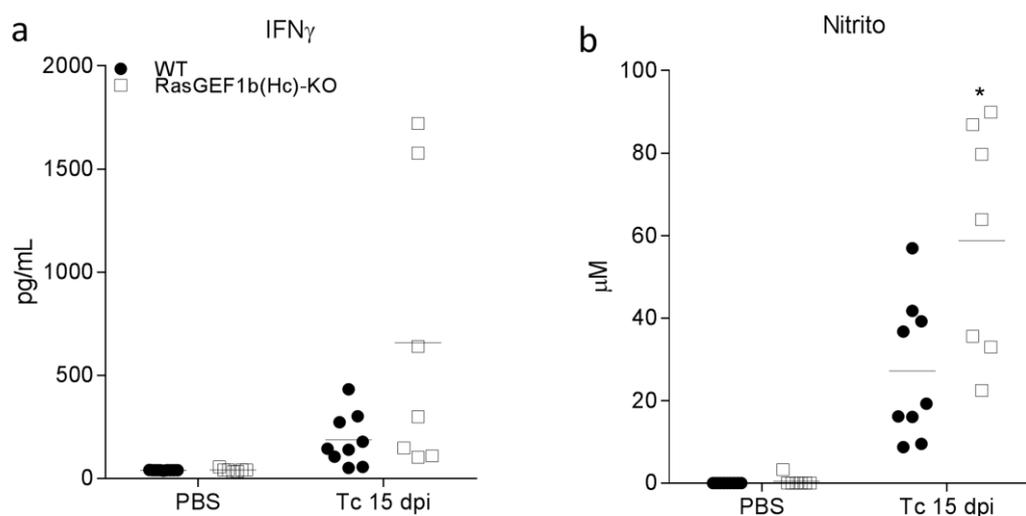


**Figura 17. Níveis de mRNA de genes induzidos por *Ifn-γ* no fígado de camundongos WT e RasGEF1b(Hc)-KO infectados *T. cruzi*.** Cem miligramas de fígado de animais WT e RasGEF1b(Hc)-KO infectados ou não com *T. cruzi* (cepa Y) foram obtidos após 15 dpi. A partir desses órgãos foi realizada a extração do RNA total, síntese da primeira fita de cDNA e, por fim, PCR quantitativa para os alvos: *Nos2* (a), *Cxcl10* (b), *Irf1* (c) e *Rpl32* (gene normalizador). Os valores de abundância relativa do mRNA foram calculados com base no método comparativo de ciclo de limiar ( $2^{-\Delta Ct}$ ), onde  $\Delta Ct = Ct_{(\text{gene alvo})} - Ct_{(Rpl32)}$ . Valores dados como média  $\pm$  desvio padrão (DP), n = 4 (WT); n=7 [RasGEF1b(Hc)-KO]. Valores significativamente diferentes comparados com WT (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01), Two-way ANOVA, Bonferroni *post-test*.

### **5.8 Elevada produção de IFN- $\gamma$ e nitrito por células não-parenquimais do fígado provenientes de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO infectados com *T. cruzi***

O fígado é um tecido que participa do controle da multiplicação de *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção por meio da produção de diversas citocinas, dentre as quais o Ifn- $\gamma$  medeia mecanismos protetores, tais como a produção de óxido nítrico (Sardinha *et al.*, 2006; Carrera-Silva *et al.*, 2010). Nos animais RasGEF1b(Hc)-KO já observamos que há uma indução significativa na expressão gênica de *Nos2* (Fig. 17a). Para verificar se há também uma maior produção de Ifn- $\gamma$  e NO por células não-parenquimais hepáticas (LNPCs) que se encontram no fígado no 15<sup>o</sup> dia após a infecção por *T. cruzi*, animais WT e RasGEF1b(Hc)-KO foram infectados, os fígados removidos e as células não-parenquimais obtidas e cultivadas para posterior obtenção de sobrenadante para quantificação de Ifn- $\gamma$  e NO. Células obtidas de animais tratados com PBS foram usadas como controle.

As concentrações de Ifn- $\gamma$  e óxido nítrico no sobrenadante de cultura das LNPCs de animais tratados com PBS foram bastante reduzidas ou não detectadas (Fig. 18a, b), como esperado. No 15<sup>o</sup> dpi, as células de WT e RasGEF1b(Hc)-KO produziram quantidades expressivamente maiores de Ifn- $\gamma$  e NO, quando comparados às células tratadas com PBS apenas (Fig. 18a, b). Corroborando com os dados de expressão gênica, concentrações significativamente maiores de Ifn- $\gamma$  (657,1 ng/mL  $\pm$  DP; Fig. 18a) e NO (58,8  $\mu$ M  $\pm$  DP; Fig. 18b) foram detectadas no sobrenadante das LNPCs provenientes de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO quando comparada com WT (Ifn- $\gamma$ : 186,9 ng/mL  $\pm$  DP; Nitrito: 27,2  $\mu$ M  $\pm$  DP).



**Figura 18. Quantificação de Ifn- $\gamma$  e NO em sobrenadante de cultura de LNPC's.** Células não-parenquimais hepáticas foram isoladas de camundongos WT e RasGEF1b(Hc)-KO tratados com PBS ou infectados via i.p. com *T. cruzi* (cepa Y), no 15<sup>o</sup> dpi, como descrito na sessão Material e Métodos. As células foram plaqueadas, incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%), a 37°C e o sobrenadante coletado após 48 horas. As concentrações de Ifn- $\gamma$  (a) e Nitrito (b) foram quantificadas, respectivamente, por ELISA e ensaio de Griess. Valores dados como média  $\pm$  desvio padrão; n = 9 (WT); n=7 [RasGEF1b(Hc)-KO]. Representativo de um experimento. Valores significativamente diferentes comparados com WT (\*p < 0,05), Two-way ANOVA, Bonferroni *post-test*.

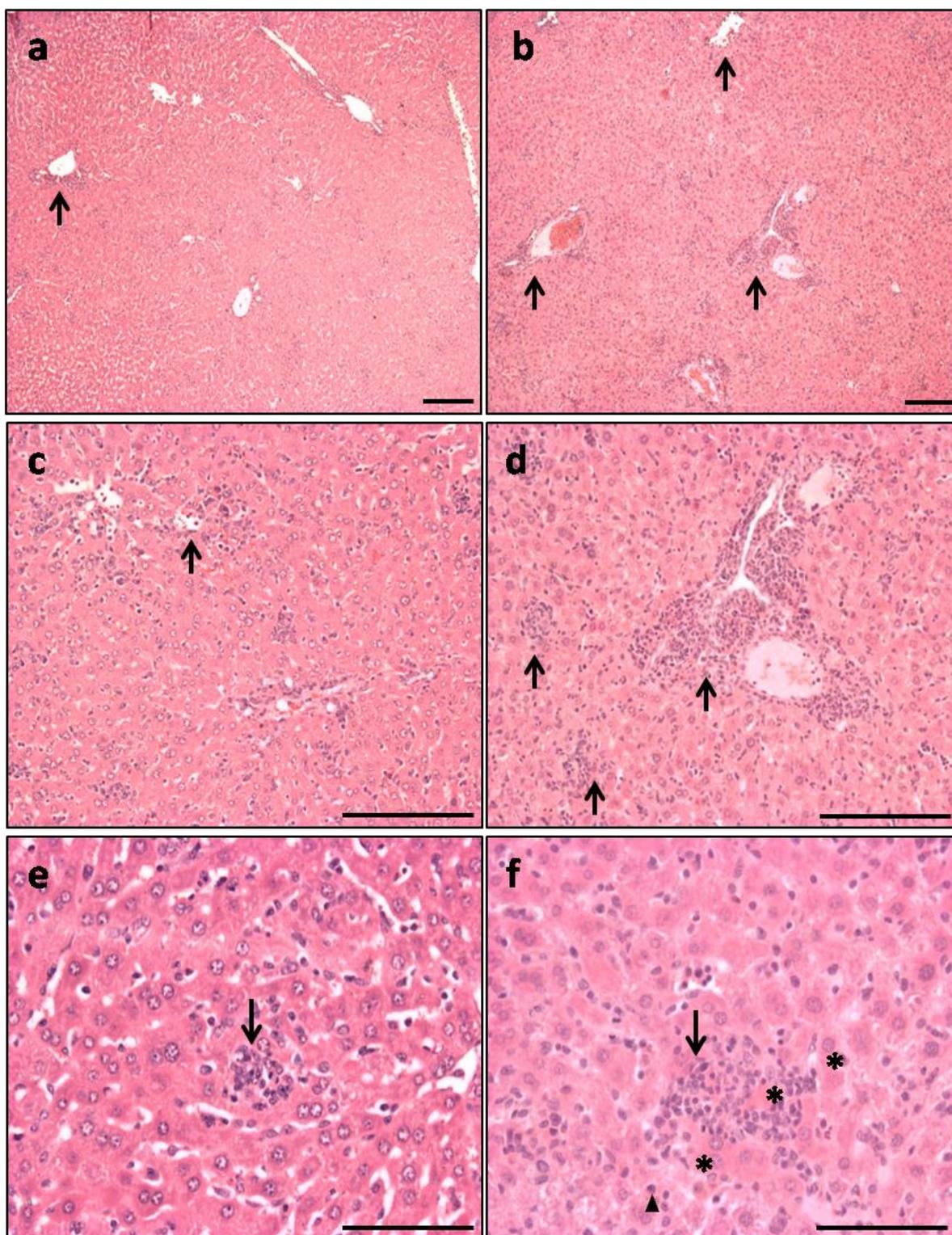
### 5.9 Fígado de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO apresentam alterações histopatológicas distintas dos camundongos WT durante a infecção com *T. cruzi*

Uma vez que o fígado é um tecido acometido pela infecção por *T. cruzi* (Sardinha *et al.*, 2006; Carrera-Silva *et al.*, 2010) e, ainda, foram observadas alterações na produção de Ifn- $\gamma$  e NO por células não-parenquimais do fígado de animais RasGEF1b(Hc)-KO infectados com *T. cruzi*, nós decidimos verificar se houve alterações histopatológicas neste tecido.

Assim, camundongos WT e RasGEF1b(Hc)-KO foram infectados com 100 formas da cepa Y de *T. cruzi*, e no 15<sup>o</sup> dpi os animais foram eutanaziados. Os fígados foram dissecados, fixados e submetidos ao processamento histológico. Os cortes foram corados com HE. Na micrografia representada na figura 19a, é possível observar que há uma inflamação discreta no fígado de animais WT, com poucos focos inflamatórios (Fig

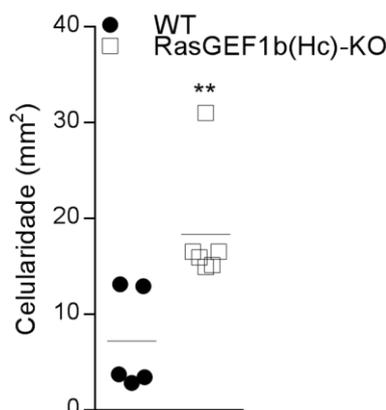
19a, seta), enquanto que focos maiores e em maior número são observados no tecido de animais RasGEF1b(Hc)-KO (Fig. 19b, setas). Ainda, o infiltrado em animais WT é formado predominantemente por células mononucleares (não demonstrado nas micrografias) agrupadas em focos discretos e, nos tecidos analisados, não foram observados sinais de degeneração nos hepatócitos (Fig. 19c, e). Por outro lado, o infiltrado inflamatório no fígado de animais RasGEF1b(Hc)-KO encontra-se mais concentrado nas proximidades de vasos hepáticos (Fig. 19d), sendo predominado por células mononucleares, podendo apresentar também algum infiltrado polimorfonuclear. Nesses tecidos foi possível observar alterações celulares, com hepatócitos apresentando acidofilia citoplasmática e sinais de degeneração necrótica (Fig. 19f), indicados por asteriscos).

Análises quantitativas de celularidade foram realizadas afim de confirmar o maior infiltrado inflamatório observado nos camundongos RasGEF1b(Hc)-KO. A celularidade foi calculada pela área ocupada pelos núcleos em relação a área total analisada do tecido. O resultado obtido está representado na figura 20, sendo a celularidade no tecido hepático de animais RasGEF1b(Hc)-KO significativamente maior do que no fígado de WT.



**Figura 19. Histopatologia do fígado de animais WT e RasGEF1b(Hc)-KO infectados com *T. cruzi*.** Micrografias representativas de fígado de animais WT (a, c, e) e RasGEF1b(Hc)-KO (b, d, f) em aumentos de 4, 10 e 40 vezes respectivamente. Os tecidos foram obtidos de camundongos após 15 dias de infecção, fixados em paraformaldeído, submetidos à rotina histológica e corados com HE. Em a, c, e observamos a presença de infiltrado inflamatório

(setas) constituído predominantemente por células mononucleares, distribuídas em focos discretos e sem associação com alterações degenerativas significativas dos hepatócitos. Nota-se em b, d, f (animais nocautes) aumento do infiltrado inflamatório, com focos maiores, periportais e intraparenquimatosos. Os focos são constituídos por mono e polimorfonucleares que se associam com fenômenos necrótico-degenerativos dos hepatócitos, que se apresentam com acidofiliacitoplasmática (\*). Barras de escala: 5  $\mu$ m (aumentos de 4x e 10x); 10  $\mu$ m (aumento de 40x).

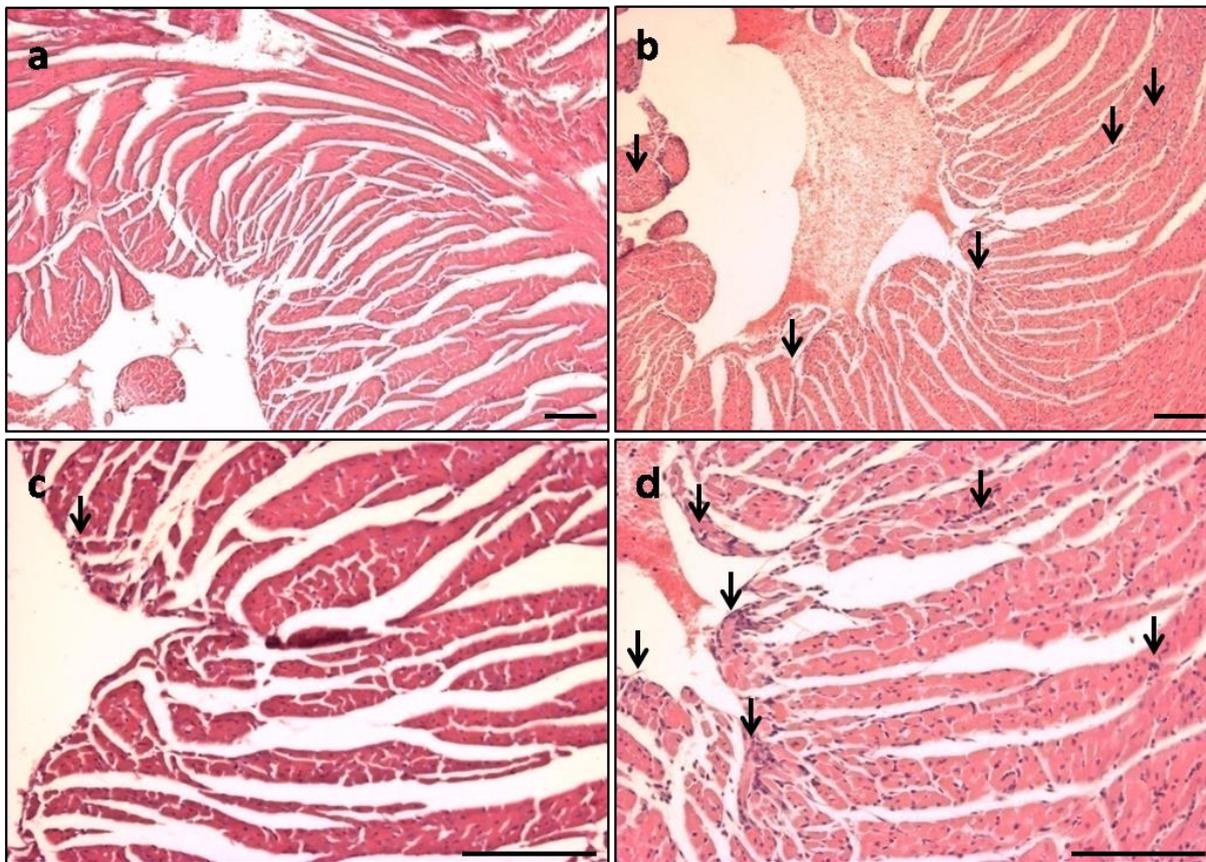


**Figura 20. Quantificação do infiltrado inflamatório no fígado.** A inflamação observada no fígado dos animais infectados com *T. cruzi* foi quantificada por meio da celularidade, que corresponde à área ocupada por núcleos em relação à área de tecido analisada. Resultado representativo de dois experimentos independentes. Valores dados como média  $\pm$  desvio padrão; n = 5 (WT); n = 7 [RasGEF1b(Hc)-KO]. Valores significativamente diferentes comparados com WT (\*p < 0,05), teste t.

### 5.10 Coração de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO tem maior inflamação tecidual durante a infecção por *T. cruzi*

O coração é um importante tecido alvo da infecção pelo *T. cruzi* ((Rassi e Marin-Neto, 2010). Análises histopatológicas foram realizadas a partir de cortes histológicos do músculo cardíaco de animais WT e RasGEF1b(Hc)-KO após 15 dias de infecção. Discreta inflamação foi observada no coração de camundongos WT (Fig. 21a). Por outro lado, focos inflamatórios predominantemente mononucleares foram localizados nos cortes histológicos de coração de RasGEF1b(Hc)-KO (Fig. 21b). Em maior aumento é possível observar que há um perfil de inflamação maior nos animais

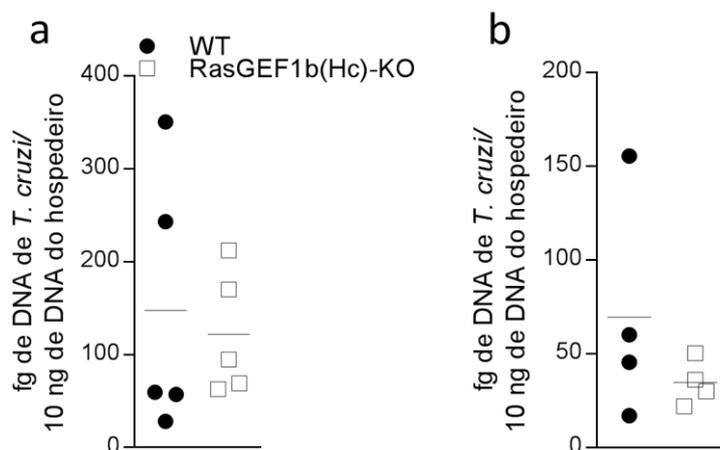
RasGEF1b(Hc)-KO (Fig. 21d) comparados com o tecido de animais WT (não quantificado) (Fig. 21c).



**Figura 21. Análises histopatológicas de coração de animais WT e RasGEF1b(Hc)-KO durante fase aguda da infecção por *T. cruzi*.** Corações de camundongos WT e RasGEF1b(Hc)-KO foram obtidos após 15 dias de infecção e submetidos a rotina histológica, seguida de coloração por HE. Micrografias representativas de cortes histológicos de músculo cardíaco ventricular de animais selvagens (a, c) e RasGEF1b(Hc)-KO (b, d). Observa-se (setas) infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear no tecido cardíaco dos animais nocautes b (4x) e d (10x). Barras de escala: 5  $\mu$ m. Resultado representativo de dois experimentos independentes.

### 5.11 Parasitismo tecidual no coração e fígado de animais RasGEF1b(Hc)-KO

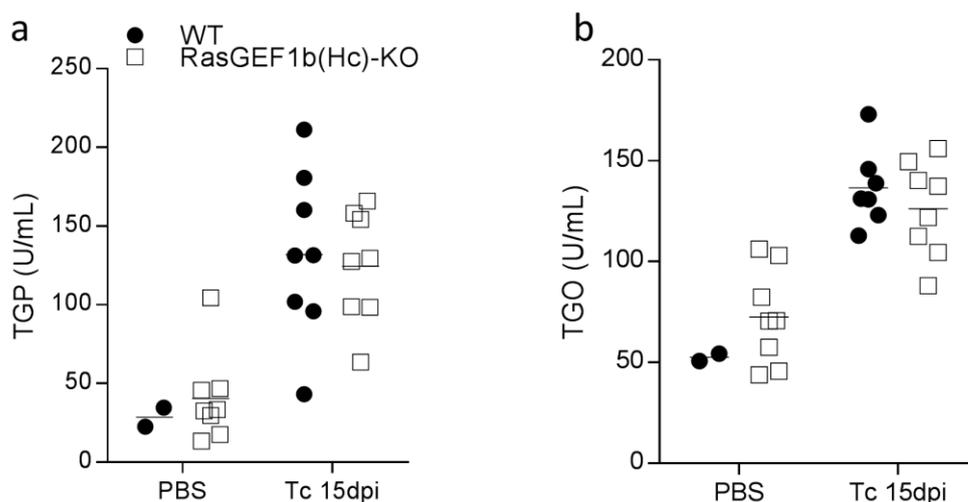
Para verificar se a elevada produção de  $\text{Ifn-}\gamma$  observada nos camundongos RasGEF1b(Hc)-KO, associada à maior inflamação tecidual evidenciada pelas análises histopatológicas, acarretaria em alteração na carga parasitária tecidual, fígado e coração de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO infectados foram coletados para análise de parasitismo tecidual. No 15° dpi foi realizada a extração de DNA dos tecidos, obtidos de camundongos WT e RasGEF1b(Hc)-KO. A quantificação da carga de parasitos inferida pela concentração do DNA de *T. cruzi* nas amostras de tecido revelou uma sutil redução na carga parasitária no fígado de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO, comparado com WT (Fig. 22a). A mesma tendência foi observada nas análises do tecido cardíaco (Fig. 22b). No entanto, não houve significância estatística entre os valores.



**Figura 22. Parasitismo tecidual no fígado e coração de animais WT e RasGEF1b(Hc)-KO infectados com *T. cruzi*.** Camundongos WT e RasGEF1b(Hc)-KO foram infectados via i.p. com *T. cruzi* (cepa Y) e no 15° dpi eutanasiados para de órgãos. Parasitismo tecidual no fígado (a) e coração (b) dos animais foi quantificado por QPCR. Resultado representativo de um experimento. Valores dados como média  $\pm$  desvio padrão; n = 4. Valores comparados pelo teste t.

### 5.12 A lesão hepática em camundongos RasGEF1b(Hc)-KO é similar à de camundongos WT durante a infecção com *T. cruzi*

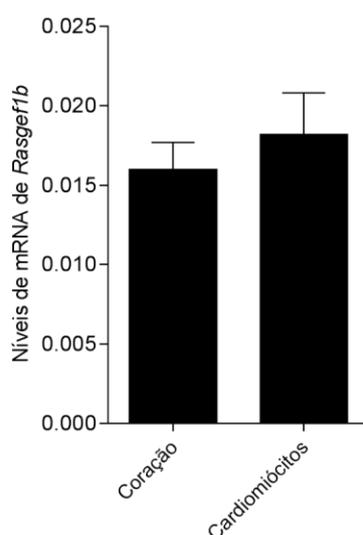
Os resultados até então demonstraram alterações patológicas no fígado dos animais RasGEF1b(Hc)-KO. Para quantificar se tais alterações foram acompanhadas de maior dano hepático, os níveis das transaminases glutâmico-oxalacética (TGO) e glutâmico-pirúvica (TGP) foram analisados no soro de camundongos WT e RasGEF1b(Hc)-KO, tratados com PBS (grupo controle) ou infectados com *T. cruzi*. Como esperado, durante a infecção ocorreu um aumento na concentração plasmática de TGP (Fig. 23a) e TGO (Fig. 23b) tanto nos animais selvagens como nos nocautes, comparados aos respectivos grupos controles. No entanto, não foram observadas diferenças significativas nos níveis das transaminases hepáticas quando comparados os grupos WT e RasGEF1b(Hc)-KO (Fig. 23a,b).



**Figura 23. Análise de dano hepático em animais WT e RasGEF1b(Hc)-KO infectados com *T. cruzi*.** Soro obtido de animais WT e RasGEF1b(Hc)-KO após 15 dias de infecção com *T. cruzi* ou tratados com PBS foi utilizado para quantificar as transaminases hepáticas TGP (a) e TGO (b). Resultados representativos de dois experimentos independentes. Valores dados como média  $\pm$  desvio padrão; n = 8. Valores comparados por Two-way ANOVA, Bonferroni *post-test*.

### 5.13 Geração de camundongos com deleção condicional de RasGEF1b em cardiomiócitos

Como já demonstrado na figura 11 desta tese, níveis de mRNA de RasGEF1b são detectados no coração. Para verificar qual a contribuição dos cardiomiócitos nestes níveis, nós conduzimos análises de RT-qPCR em amostras de cardiomiócitos isolados de camundongos C57BL/6 adultos. O resultado mostra que os níveis de mRNA de *Rasgef1b* em cardiomiócitos são comparáveis aos observados no tecido cardíaco (Fig. 24).

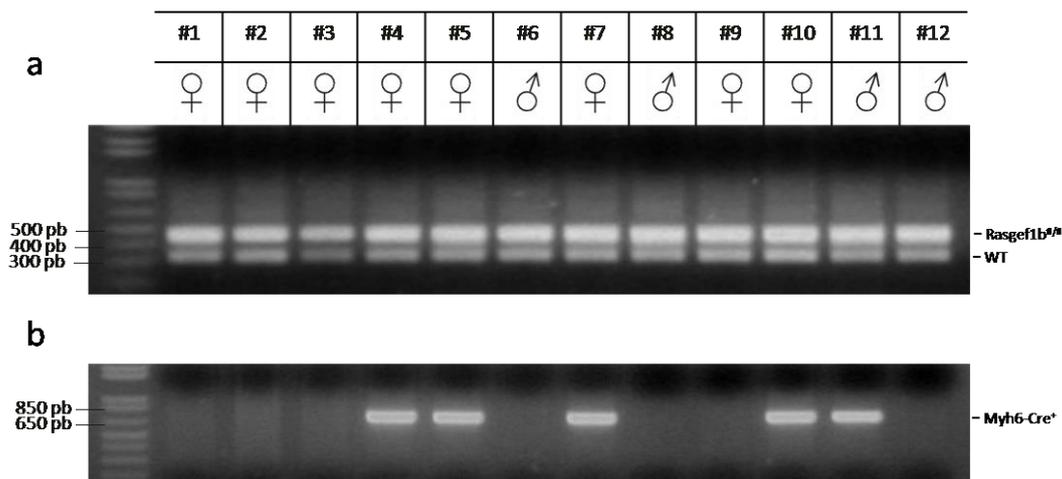


**Figura 24. Abundância relativa de mRNA de *Rasgef1b* no coração e em cardiomiócitos.** RNA total do coração ou de cardiomiócitos isolados de camundongos C57BL/6 foi obtido e a partir deste sintetizado a primeira fita de cDNA. PCR quantitativa foi realizada para detectar os níveis dos transcritos de *Rasgef1b* e *Rpl32* (gene normalizador). A abundância relativa do mRNA foi calculada de acordo com o método comparativo de ciclo de limiar ( $2^{-\Delta Ct}$ ). Valores dados como média  $\pm$  desvio padrão; n = 4.

Tendo demonstrado, portanto, que cardiomiócitos expressam RasGEF1b, nós decidimos gerar uma nova linhagem de camundongos cuja deleção de *Rasgef1b* fosse restrita a essas células. Assim, com essa finalidade, camundongos *Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>* foram cruzados com animais *Myh6-Cre<sup>+/-</sup>*. A obtenção de animais *Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>;Myh6-Cre<sup>+/-</sup>*, designados doravante RasGEF1b(Cm)-KO, era dependente de genotipagem contínua das ninhadas, pois as matrizes deveriam ser formadas sempre de um animal com o gene

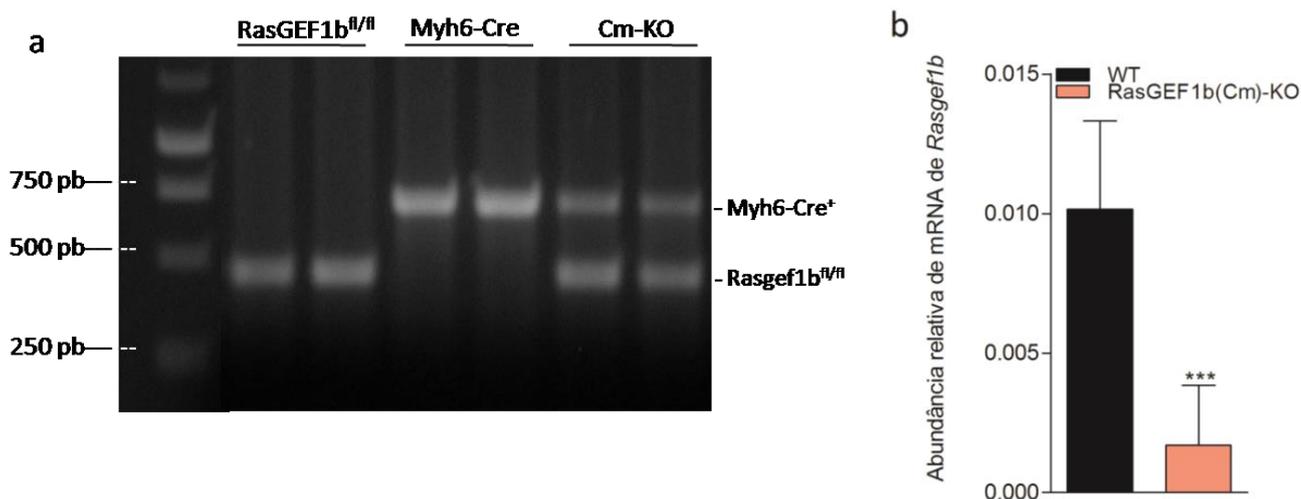
*Rasgef1b* flanqueado por dois sítios loxP (homozigoto) e o outro contendo no genoma a expressão da recombinase Cre direcionada pelo promotor da subunidade pesada da cadeia da miosina Myh6 em apenas um alelo, ou seja, heterozigoto Myh6-Cre<sup>+/-</sup>. Esta estratégia era necessária, uma vez que animais homozigotos para a Myh6-Cre são natimortos (Agah et al., 1997). A identificação dos animais nocautes cardíacos era feita rotineiramente pela genotipagem por PCR de DNA genômico obtido da cauda dos animais, seguido de fracionamento em gel de agarose.

Na figura 25 é mostrada a genotipagem da ninhada gerada a partir do primeiro cruzamento entre camundongos *Rasgef1b*<sup>fl/fl</sup> e *Myh6-Cre*<sup>+/-</sup>. Como esperado, todos os animais foram heterozigotos *Rasgef1b*<sup>fl/+</sup>, sendo claramente observada a amplificação de dois fragmentos de tamanhos distintos: uma de 454 pb, referente ao gene flanqueado, e outra de 320 pb referente ao alelo selvagem (Fig 25a). Cinco animais Cre positivos foram selecionados (Fig. 25b) e a partir destes foram formados novos cruzamentos com camundongos *Rasgef1b*<sup>fl/fl</sup> para finalmente serem gerados os nocautes condicionais cardíacos RasGEF1b(Cm)-KO.



**Figura 25. Genotipagem por PCR de DNA genômico do primeiro cruzamento de camundongos *Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>* e *Myh6-Cre<sup>+/-</sup>*.** O DNA genômico da cauda dos 12 camundongos gerados a partir cruzamento de fêmeas *Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>* com machos *Myh6-Cre<sup>+/-</sup>* foi extraído e amplificado por PCR com os iniciadores P3 e P4 (a) ou por Cre1 e Cre2 (b). Os produtos de amplificação foram fracionados em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídeo. Após fracionamento, o gel foi fotodocumentado em transluminador de luz ultravioleta. (a) *Ladder*: 1Kb plus ladder (Invitrogen); em todas as canaletas: fragmentos de 320 pb (alelo *Rasgef1b*) e 454 pb (alelo *Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>*). (b) *Ladder*; canaletas #4, #5, #7, #10 e #11: fragmento de 650 pb (*Myh6-Cre<sup>+</sup>*).

Análises de PCR a partir do DNA genômico obtido das ninhadas seguintes deviam apresentar os seguintes tamanhos de amplicons para os respectivos genótipos (Fig. 26): a) *flox/flox*: produto de 454 pb amplificado pelo par de oligonucleotídeos P3 x P4, correspondente ao alelo *Rasgef1b* flanqueado por sítios loxP; b) *wt/wt*: produto de 320 pb amplificado pelo par de oligonucleotídeos P3 x P4 correspondente ao alelo *Rasgef1b*; c) *flox/wt*: um produto de 454 pb e outro de 320 pb, amplificados pelo mesmo par, correspondente a um alelo *Rasgef1b<sup>fl/-</sup>* e o outro *Rasgef1b*. d) *Myh6-Cre<sup>+</sup>*: produto de 650 pb amplificado pelo par de oligonucleotídeos Cre1 x Cre2, correspondente à recombinase Cre cuja expressão está sob o controle da região promotora de *Myh6*. Assim, animais com deleção gênica cardíaca condicional de RasGEF1b, ou seja, RasGEF1b(Cm)-KO, foram diagnosticados apenas quando havia amplificação dos fragmentos correspondentes aos alelos *Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>* (454-pb) e Myh6-Cre positivo (650-pb) (Fig 26, canaletas Cm-KO).



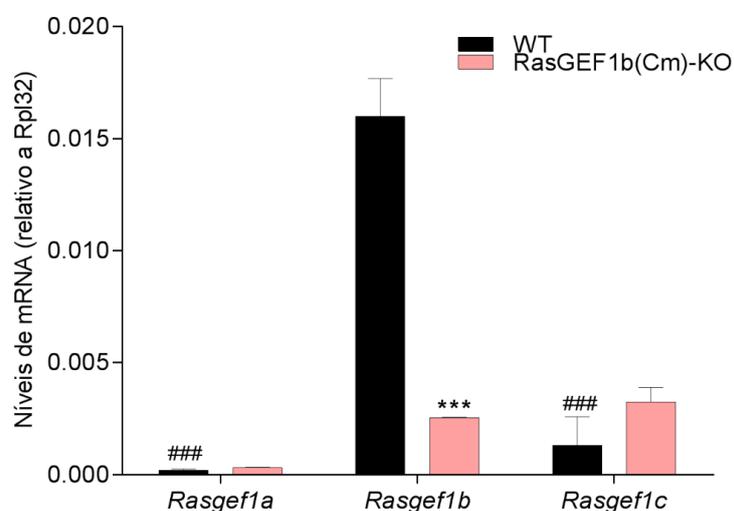
**Figura 26. Genotipagem de camundongos RasGEF1b(Cm)-KO por PCR de DNA genômico e análise dos níveis de mRNA no coração.** O DNA genômico da cauda de camundongos RasGEF1b(Cm)-KO foi extraído, amplificado por PCR e os produtos de amplificação fracionados em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídeo. Gel fotodocumentado em transluminador UV. As bandas observadas no gel são correspondentes aos fragmentos amplificados pelos iniciadores P3 e P4 ou por Cre1 e Cre2. (a) *Ladder*: 1Kb DNA ladder (Promega); Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>: fragmentos de 454 pb (alelo *Rasgef1b*<sup>fl/fl</sup>); Myh6-Cre: fragmento de 650 pb (*Myh6-Cre*<sup>+</sup>); Cm-KO: fragmentos de 454 pb e 650 pb (*Rasgef1b*<sup>fl/fl</sup>-*Myh6-Cre*<sup>+</sup>). (b) Corações de camundongos WT e RasGEF1b(Cm)-KO foram coletados; procedeu-se a extração de RNA total e síntese de cDNA para análise dos níveis de mRNA de RasGEF1b, em relação ao gene referência *Rpl32*. A abundância relativa de mRNA foi calculada pelo método de Livak: ( $2^{-\Delta Ct}$ ). Os valores foram dados como média  $\pm$  desvio padrão; WT (n = 6); RasGEF1b(Cm)-KO (n = 5). Valores significativamente diferentes comparados com WT (\*\*\*)  $p < 0,001$ , teste t.

De maneira semelhante ao que foi feito para os outros dois nocautes (Fig. 12c), analisamos os níveis de mRNA de RasGEF1b no coração de camundongos RasGEF1b(Cm)-KO para inferir o percentual de deleção de obtido no tecido. Assim, os níveis basais de mRNA no coração foram quantificados por RT-qPCR, utilizando camundongos WT como controle. Nos camundongos RasGEF1b(Cm)-KO os níveis basais de mRNA do RasGEF1bde foram significativamente reduzidos, como mostrado no gráfico da figura 26b. O percentual de deleção observado nesses animais foi cerca de 83%, considerando os valores das médias de cada grupo (Fig. 26b).

### 5.14 Rasgef1b é o membro da família RasGEF1b mais abundante no coração e em cardiomiócitos

Ainda, permaneceu por ser determinada qual é a abundância relativa do mRNA de RasGEF1b em relação aos demais membros da família RasGEF1, ou seja, RasGEF1a e RasGEF1c, no tecido cardíaco. Para tanto, corações provenientes de animais WT foram obtidos e analisados por RT-qPCR. Na figura 27 (barras pretas) observa-se uma robusta e significativa expressão relativa do mRNA de RasGEF1b, que é cerca de dez vezes maior do que os níveis de *Rasgef1c* e quase oitenta vezes maior do que os níveis de *Rasgef1a* no coração.

Posteriormente, para verificar se a deleção condicional do *Rasgef1b* em cardiomiócitos impactaria na expressão de *Rasgef1a* e *Rasgef1c* no coração, análises foram conduzidas em animais RasGEF1b(Cm)-KO. No coração de camundongos RasGEF1b(Cm)-KO, os níveis mRNA de RasGEF1b são comparáveis ao de RasGEF1c, e significativamente maior do que RasGEF1a (Fig. 27, barras rosas).



**Figura 27. Análise dos níveis do mRNA de membros da família RasGEF1 no coração camundongos WT e RasGEF1b(Cm)-KO.** Corações foram obtidos de camundongos WT e RasGEF1b(Cm)-KO para obtenção de RNA total, síntese de cDNA e quantificação dos níveis de mRNA de RasGEF1a, RasGEF1b e RasGEF1c por PCR quantitativa. Valores foram dados como média  $\pm$  desvio padrão, n=5. Valores significativamente diferentes comparados aos níveis do mRNA de *Rasgef1b* em WT (\*\*\*)  $p < 0,001$ , teste t.

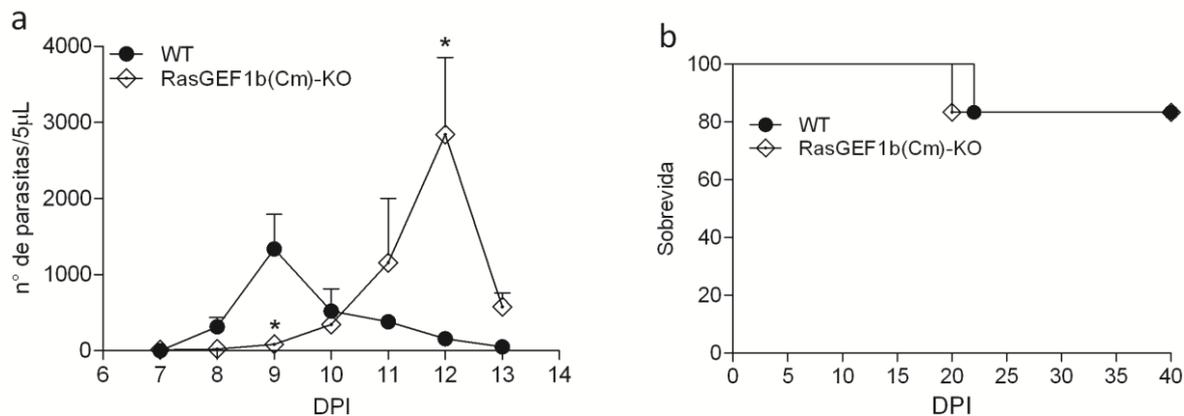
De forma interessante, o perfil de expressão destes genes em cardiomiócitos obedecem ao mesmo padrão observado no tecido cardíaco como um todo. Estes resultados demonstraram, assim, que RasGEF1b é o membro da família RasGEF1 mais abundante no coração, o que reforça a hipótese de que esse GEF desempenha uma função no tecido cardíaco.

### **5.15 A deficiência de RasGEF1b em cardiomiócitos resulta em início tardio da parasitemia sem afetar a sobrevida dos animais infectados**

Decidimos então investigar qual o impacto da deficiência cardiomiócito-específica de RasGEF1b em resposta à infecção pelo *T. cruzi*. Para tanto, animais WT e RasGEF1b(Cm)-KO foram infectados e monitorados quanto a parasitemia, do 7º até o 13º dia pós-infecção, e a mortalidade diariamente até o 40º dpi.

De modo surpreendente, o resultado mostrou que, enquanto o pico da parasitemia é atingido no nono dia pós-infecção em camundongos WT, o mesmo não ocorre em camundongos RasGEF1b(Cm)-KO, quando o número de parasitos encontra-se significativamente reduzido (Fig. 28a). Ademais, o número de parasitos circulantes nos camundongos RasGEF1b(Cm)-KO atingiu seu pico no 12º dpi, momento no qual a parasitemia já encontra-se reduzida nos animais WT. No 13º dpi, o número de parasitos nos animais WT encontrava-se em quantidades similares ao de camundongos RasGEF1b(Cm)-KO. Embora tais diferenças na parasitemia foram encontradas, a sobrevida dos animais RasGEF1b(Cm)-KO foi similar à de camundongos WT (Fig. 28b).

Esses resultados, embora ainda preliminares, sugerem que RasGEF1b desempenha um papel em cardiomiócitos tanto em condições fisiológicas quanto patológicas.



**Figura 28. Análise de sobrevivência e parasitemia de camundongos RasGEF1b(Cm)-KO infectados com *T. cruzi*.** Animais WT e RasGEF1b(Cm)-KO foram infectados i.p. com 100 formas tripomastigotas de *T. cruzi*. A quantidade de parasitos sanguíneos foi monitorada do 7° ao 13° dpi (a). A sobrevivência dos animais foi acompanhada diariamente até o 40° dpi (b). Resultados representativos de dois experimentos independentes. Os valores foram dados como média  $\pm$  desvio padrão, n=5. Valores significativamente diferentes comparados com WT (\* $p < 0,05$ ), teste t.

## 6. Discussão

A transdução de sinal mediada pela ativação de TLRs por componentes celulares do *T. cruzi* é essencial na produção de citocinas críticas no controle da infecção e na sobrevivência do hospedeiro (Campos et al., 2004; Báfica et al., 2009). Além dos fatores secretados produzidos pelas células do sistema imune, proteínas citoplasmáticas também desempenham um papel importante na regulação da ativação de genes inflamatórios (Hamano et al., 2003; Santiago et al., 2005). Neste contexto, o RasGEF1b é um fator de troca de nucleotídeos guanina cuja expressão é induzida em macrófagos estimulados com agonistas de TLRs, sendo a tGPI-mucina derivada de *T. cruzi* um desses agonistas (Ferreira et al., 2002). Outros achados indicavam o envolvimento de RasGEF1b na infecção *in vivo* por *T. cruzi* (Ferreira et al., 2002; Andrade et al., 2010). Porém, evidências de que esta molécula de fato está envolvida na resposta imune a este parasito não haviam sido mostradas até então.

O ponto de partida para os estudos funcionais de RasGEF1b na resposta imune inata ao *T. cruzi* foi a infecção *in vitro* em macrófagos diferenciados das células precursoras da medula. Sendo o macrófago uma célula de origem hematopoiética,

eventualmente foram utilizadas células de medula obtidas de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO, ou seja, animais deficientes de RasGEF1b em células hematopoiéticas. Nestes animais a deleção do gene alvo pode não ser de 100% (Siegemund et al., 2015), sendo no caso do RasGEF1b aproximadamente 85% (Silva et al., manuscrito em preparação). Isso poderia justificar os níveis de RasGEF1b que foram observados nos BMDMs analisados por qPCR.

Podem ser identificados três principais eventos no processo da infecção de macrófagos por *T. cruzi*: a) internalização, que envolve diferentes mecanismos de ambas as células (hospedeira e parasito), tais como o processo ativo do parasito de recrutamento de lisossomos da célula hospedeira para o local de entrada, induzindo a formação do vacúolo parasitóforo (Tardieux *et al.*, 1992); ou por meio da via fagocítica/endocítica, envolvendo proteínas relacionadas ao endereçamento e tráfico de vesículas e sinalização mediada por TLRs (Maganto-Garcia *et al.*, 2008). b) multiplicação, processo que sucede à transformação dos tripomastigotas em amastigotas, devido ao ambiente ácido do vacúolo (Tomlinson *et al.*, 1995). Os amastigotas se dividem no citoplasma da célula por divisão binária (revisado por Andrade e Andrews, 2005). Concomitantemente ao processo de multiplicação, em macrófagos primados com Ifn- $\gamma$ , a sinalização disparada pela ativação dos receptores imunes pode levar à síntese de moléculas efetoras tripanocidas, como o óxido nítrico, que irão controlar a multiplicação das formas amastigotas (Vespa et al., 1994); c) liberação, que ocorre após um período de quiescência dos amastigotas, que retornam para a forma tripomastigota e saem da célula infectada após o rompimento da membrana plasmática, estando assim livres para infectar outras células (revisado por Andrade e Andrews, 2005).

Nos BMDMs deficientes de RasGEF1b não foram observadas diferenças expressivas no percentual de infecção, sugerindo que RasGEF1b não participa de mecanismos relacionados a invasão do parasito nesse tipo celular. Ademais, a semelhança no número de parasitos intracelulares presentes nas células selvagens e nocautes, bem como no número de tripomastigotas liberados das culturas de BMDMs infectadas com *T. cruzi* (Figuras x e y), sugerem que o RasGEF1b é dispensável em mecanismos celulares envolvidos no controle da multiplicação e na sobrevivência do parasito em cultura.

Apesar de não haver significância estatística, vale ressaltar que houve uma tendência em células nocautes para RasGEF1b, que foram primadas com Ifn- $\gamma$ , de

apresentar menos amastigotas. Essa tendência, no entanto, não pôde ser relacionada à produção de NO pelos macrófagos deficientes de RasGEF1b, pois estas células apresentaram menores níveis de óxido nítrico no sobrenadante de BMDMs primados com Ifn- $\gamma$  e infectados com *T. cruzi*. Além da citotoxicidade provocada por NO, outros mediadores estão envolvidos no controle intracelular do *T. cruzi* em macrófagos, tais como as espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) (Gupta *et al.*, 2011; Barroso *et al.*, 2016). Assim, é possível que haja nos macrófagos deficientes de RasGEF1b uma produção elevada de outros agentes tripanocidas que estejam compensando menor produção de NO.

Além de ter a expressão induzida em macrófagos tratados com tGPI mucinas, o *Rasgef1b* foi inicialmente descrito como sendo um gene cuja expressão é induzida em alguns tecidos, como no coração, baço e fígado de camundongos C3H/HeJ, 20 dias após infecção com a cepa CL de *Trypanosoma cruzi* (Ferreira *et al.*, 2002). Em outro estudo realizado colaborativamente por nosso grupo foi mostrado que havia indução de *Rasgef1b* no baço de camundongos C57BL/6 após 18 dias de infecção com a cepa Colombiana (Andrade *et al.*, 2010). Vale ressaltar que nesses estudos os animais foram inoculados com  $5 \times 10^3$  formas tripomastigotas de cada cepa. Em nosso modelo de infecção foram utilizadas 100 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* para infectar animais C57BL/6 e, corroborando com o observado por Ferreira e colaboradores (2002), o *Rasgef1b* foi induzido no coração e no fígado dos animais infectados. No entanto, não observamos a indução do gene no baço, contraditoriamente ao que já havia sido demonstrado. É bem determinado que algumas linhagens de camundongos apresentam susceptibilidade diferencial à infecção por *T. cruzi* (Starobinas *et al.*, 1991; Roggero *et al.*, 2002; Graefe *et al.*, 2006). Além disso, as cepas são altamente heterogêneas e apresentam diferenças de virulência e imunogenicidade (Brenner, 1965; Miles, 1974; Pinto *et al.*, 1999). Essas diferenças entre modelo animal e virulência das cepas geram uma grande variação nos estudos com *T. cruzi*, sobretudo aqueles que investigam perfis moleculares e de expressão de moléculas envolvidas na resposta ao parasito (Adesse *et al.*, 2010).

Os estudos *in vivo* com camundongos RasGEF1b nocautes sugerem um fenótipo complexo para esta molécula no contexto da infecção por *T. cruzi*. Inicialmente, os resultados obtidos com camundongos nocautes completos (RasGEF1b-KO) parecem não sustentarem envolvimento de RasGEF1b na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que não foram observadas alterações na susceptibilidade do animal nem tanto

na regulação sistêmica da produção de citocinas, onde os perfis foram essencialmente semelhantes aos dos animais WT. A diferença na parasitemia observada entre animais WT e RasGEF1b-KO, expressa pelo maior número de parasitos no sangue dos animais nocautes no 11° e 12° dia da infecção não foi reproduzida em outros dois experimentos realizados (dados não mostrados).

De modo semelhante, camundongos RasGEF1b(Hc)-KO apresentaram um perfil de resistência e curva de parasitemia semelhantes ao observado nos animais WT. De nota, a taxa de sobrevivência desses camundongos foi bastante similar mesmo quando inóculos elevados foram administrados (1.000 ou 10.000 formas – dados não mostrados). No entanto, as concentrações de Ifn- $\gamma$  e Il-6 encontravam-se mais elevadas no soro de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO no 15° dia pós-infecção pela cepa Y de *T. cruzi*. Vale ressaltar que a cinética de produção de citocinas observada em nosso modelo não corroborou com os dados da literatura, uma vez que a produção mais elevada dessas citocinas na fase aguda da infecção com a cepa Y geralmente é observada no dia do pico de parasitemia (Campos *et al.*, 2004; Santiago *et al.*, 2005; Bafica *et al.*, 2006).

Primeiramente, alguns detalhes merecem ser comentados: na genotipagem de camundongos com a deleção condicional em células hematopoiéticas, foram comumente observados dois padrões de bandas no gel de agarose: uma correspondente ao alelo flanqueado por loxP e outra ao alelo que sofreu a recombinação. Este fato ocorre devido a análise do genótipo ser realizada a partir do DNA genômico de cauda dos animais, que apresenta uma grande variedade de células de origem não-hematopoiética, como células epiteliais, cartilagenosas e musculares (Hankenson *et al.*, 2008). Eventualmente, no momento da coleta da cauda era carregada para o tubo quantidades variadas de sangue, juntamente com a cauda do animal. Nós atribuímos, quando era observado o amplicon referente ao alelo pós recombinação (317 pb), a presença de células de origem hematopoiética provenientes do sangue. Ainda, um importante controle que utilizamos para verificar que estava havendo a recombinação em células hematopoiéticas foi a quantificação do mRNA de RasGEF1b no baço, que é o maior órgão linfóide secundário (Mebius e Kraal, 2005). A robusta redução de mRNA de RasGEF1b no tecido de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO é uma evidência contundente da recombinação do gene em células hematopoiéticas.

O aumento sistêmico de Ifn- $\gamma$  e Il-6 contribuiu para um fenótipo mais inflamatório em camundongos RasGEF1b(Hc)-KO, uma vez que, tanto esplenócitos como células não-parenquimais do fígado também produziram concentrações elevadas

de  $\text{Ifn-}\gamma$ . Além disso, tecidos acometidos pela infecção na fase aguda, como coração e fígado, apresentaram maior infiltrado inflamatório. A concentração mais elevada de Il-6 no sangue, juntamente com as quimiocinas que possam ser produzidas localmente, pode contribuir positivamente para o processo de migração celular, uma vez que Il-6 regula a adesão de leucócitos às células endoteliais (Watson *et al.*, 1996; Erdmann *et al.*, 2016). Nestes tecidos, ainda que não tenhamos observado uma significância estatística, a carga parasitária apresentava-se de alguma maneira reduzida. Esse conjunto de resultados podem ser associados aos mecanismos reguladores de  $\text{Ifn-}\gamma$ , que é uma citocina chave durante a infecção por *T. cruzi* (Cardillo *et al.*, 1996). Além de induzir mecanismos de controle do parasito intracelular em macrófagos, tais como síntese de NO e ROS, a ativação de linfócitos T e polarização da uma resposta Th1 é também dependente desta citocina (Abrahamsohn e Coffman, 1996); (Antúnez e Cardoni, 2000); Junqueira *et al.*, 2010).

O aumento da concentração de  $\text{Ifn-}\gamma$  no soro dos animais e no sobrenadante de esplenócitos provenientes de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO não foi acompanhado por um aumento de Il-12, citocina crítica na indução de  $\text{Ifn-}\gamma$  durante a infecção por *T. cruzi* (Abrahamsohn e Coffman, 1996; Antúnez e Cardoni, 2000). No entanto, não foram avaliadas os níveis de IL-18, uma outra citocina também indutora de  $\text{Ifn-}\gamma$  (Bastos *et al.*, 2007). Essa citocina pode ser produzida tanto por células de origem hematopoiética, como macrófagos, células de Kupffer, linfócitos T e B, astrócitos, micróglia e DCs; como também por osteoblastos e queratinócitos (Akira, 2000). No fígado, Il-18 contribui para injúria tecidual induzida por choque endotóxico (Tsutsui *et al.*, 1997). Assim como Il-12, Il-18 também é fortemente induzido durante a infecção por *T. cruzi* (Meyer Zum Büschenfelde *et al.*, 1997). Entretanto, Il-18 parece desempenhar um papel marcante na infecção pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, mas não pela cepa Y (Esper *et al.*, 2014).

No fígado, a produção de  $\text{Ifn-}\gamma$  é atribuída a linfócitos ativados, tais como células NK, linfócitos T e células NKT, que residem no fígado ou são recrutadas para o tecido durante resposta à inflamação (Gao *et al.*, 2008). Mais especificamente durante a infecção pelo *T. cruzi*, há uma expressiva contribuição de diferentes populações de células NK (NK T,  $\gamma\delta$  T e  $\alpha\beta$  T) na produção local de  $\text{Ifn-}\gamma$  (Sardinha *et al.*, 2006). Apesar da resposta inflamatória mais exacerbada no fígado de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO, onde houve maior produção de  $\text{Ifn-}\gamma$  e NO pelas células não-parenquimais hepáticas e um maior infiltrado inflamatório, os níveis de transaminases

hepáticas foram semelhantes aos observados em camundongos WT. Esse fenótipo não é surpreendente, uma vez que trabalhos onde foram observados maior dano hepático em consequência de maiores níveis de  $\text{Ifn-}\gamma$  havia também uma produção desbalanceada de outras citocinas como Tnf, Il-10, Il-4 e Il-5 (Hölscher *et al.*, 2000; Hamano *et al.*, 2003). De fato, no soro dos camundongos RasGEF1b(Hc)-KO a produção de Tnf e Il-10 foi semelhante em todos os grupos.

Apesar de não observarmos um aumento no dano hepático nos animais RasGEF1b(Hc)-KO, as análises histopatológicas revelaram a presença de danos necróticos nos hepatócitos desses animais no 15° dpi, o que não foi observado em animais selvagens. Além das funções imunes desempenhadas por  $\text{Ifn-}\gamma$  no fígado, esta citocina pode atuar diretamente nos hepatócitos, induzindo morte celular por apoptose ou alterando o ciclo celular destas células (Shinagawa *et al.*, 1991; Kano *et al.*, 1999). Analisando a expressão gênica no fígado de camundongos RasGEF1b(Hc)-KO (15° dpi) de genes estimulados por  $\text{Ifn-}\gamma$ , ou seja, *Nos2*, *Irf1* e *Cxcl10* (Green *et al.*, 2017), observamos que os níveis de mRNA desses genes estavam aumentados em relação ao grupo selvagem. De fato, células não-parenquimais hepáticas derivadas destes animais produziram mais eficientemente NO. Análises semelhantes utilizando camundongos RasGEF1b-KO são necessárias para que possamos melhor compreender o papel do RasGEF1b em células do tecido hepático durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

Há ainda que se considerar o envolvimento de RasGEF1b na produção de Il-6, tendo em vista que essa citocina também foi diferencialmente produzida em camundongos deficientes de RasGEF1b no sistema hematopoiético. Essa citocina pleiotrópica é produzida por diferentes tipos celulares, tais como macrófagos e monócitos, fibroblastos, células endoteliais e linfócitos (Scheller *et al.*, 2011). A produção de Il-6 nos nocautes para RasGEF1b pode ser proveniente de monócitos sanguíneos que foram ativados por *T. cruzi*, uma vez que já foi demonstrado que monócitos humanos sanguíneos tornam-se ativados após a infecção e acumulam, dentre outras citocinas, mRNA de Il-6 (Van Voorhis, 1992).

Um das principais vantagens que os modelos transgênicos nocautes condicionais em sistema Cre-loxP apresentam em relação aos nocautes convencionais é que nesses últimos a deleção gênica ubíqua pode exercer seus efeitos em múltiplos tecidos e tipos celulares, criando um fenótipo complexo no qual é difícil distinguir a função direta em um tecido particular dos efeitos secundários que resultam da função gênica alterada em outros tecidos (Kwan, 2002). No entanto, há que se considerar que o

flanqueamento do gene alvo por sequências loxP podem, em algumas situações, contribuir para um fenótipo hipo ou hiper-mórfico (Schulz *et al.*, 2007). Considerando essa possibilidade, nós conduzimos um experimento *in vivo* com camundongos WT, RasGEF1b<sup>fl/fl</sup> e RasGEF1b-KO, e comparamos a produção de Ifn- $\gamma$  e Il-6 entre esses animais e com camundongos RasGEF1b(Hc)-KO. O resultado deste experimento eliminou a possibilidade de interferência do flanqueamento de RasGEF1b, ao menos em relação à produção de Ifn- $\gamma$  e Il-6 observada nos camundongos RasGEF1b(Hc)-KO.

No contexto da infecção por *T. cruzi*, RasGEF1b possivelmente atua regulando negativamente a produção de Il-6 em macrófagos, uma vez que nos estudos de infecção *in vitro*, BMDMs derivados de animais nocautes produziram mais Il-6 do que as células selvagens. Em estudo realizado com macrófagos peritoneais e BMDMs, foi demonstrado que RasGRP3, um GEF ativador de Rap1, regula negativamente a produção de Il-6 durante a produção desta citocina deflagrada por agonistas de TLRs, tais como TLR3/4 e 9. Neste trabalho os autores mostram ainda que a regulação de Il-6 mediada por RasGRP3 ocorre de modo mais expressivo quando utilizadas doses menores de Poly (I:C), LPS e CpG-ODN (Tang *et al.*, 2014). Evidências apontam fortemente que RasGEF1b é um GEF ativador de Rap2a (Yaman *et al.*, 2009), membro da mesma família de Rap1 (Caron, 2003). Interessantemente, assim como o RasGRP3 (Tang *et al.*, 2014), RasGEF1b é o membro de sua família de GEFs mais abundante em macrófagos (Andrade *et al.*, 2010; Silva *et al.*, em preparação). Tais evidências reforçam nossa hipótese de que RasGEF1b atua como regulador negativo de Il-6 em BMDMs, no entanto evidências mais contundentes devem ser geradas, uma vez que o resultado que obtivemos foi proveniente de um experimento apenas.

Em relação a Ifn- $\gamma$ , podemos também sugerir um mecanismo de regulação negativa desta citocina em células como linfócitos T e células NK, os principais tipos celulares produtores desta citocina (Cardillo *et al.*, 1996; (Schroder *et al.*, 2004). Não foi encontrado na literatura mecanismos de regulação de Ifn- $\gamma$  mediada por Ras GTPases. No entanto, sabe-se que proteínas RasGRP são essenciais para diferenciação de células do timo e ativação de ERK via sinalização de receptor de célula T (TCR) (Dower *et al.*, 2000; Ebinu *et al.*, 2000). Dados de expressão de RasGEF1b nestes tipos celulares ainda não foram gerados e são necessários para uma melhor compreensão do papel deste GEF na produção de Ifn- $\gamma$ .

Os cardiomiócitos desempenham várias funções durante a miopatia chagásica, além de apresentarem mecanismos mediados por ativação de TLRs (Petersen e

Burleigh, 2003; Ponce *et al.*, 2012; Lin e Knowlton, 2014). Considerando os complexos e ainda não completamente compreendidos mecanismos patofisiológicos envolvidos na resposta do tecido cardíaco à infecção pelo *T. cruzi*, juntamente com as evidências anteriormente observadas na literatura (Ferreira *et al.*, 2002) e por nós corroborada por meio de PCR quantitativa, de que o RasGEF1b é induzido no coração na fase aguda da infecção por *T. cruzi*, nós geramos camundongos deficientes desta molécula apenas em cardiomiócitos pela estratégia de recombinação mediada por Cre-loxP.

Os camundongos RasGEF1b(Cm)-KO foram continuamente gerados pelo cruzamento de animais Rasgef1b<sup>fl/fl</sup> com camundongos Myh6-Cre<sup>+/-</sup> heterozigotos, uma vez que em homozigose para a Cre, os animais são natimortos (Agah *et al.* 1997). Ainda, nos cruzamentos foram preferencialmente utilizadas fêmeas Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>, uma vez que as fêmeas Myh6-Cre<sup>+/-</sup> foram mais sensíveis à gravidez e morriam com mais frequência após gerar algumas (de 2 a 3) ninhadas. Alguns resultados obtidos pelo grupo da Dr. Silvia Guatimosim sugerem que, em contexto de hipertrofia induzido por fármaco (isoproterenol), pode haver uma disfunção cardíaca nos camundongos RasGEF1b(Cm)-KO, representado por um aumento significativo do volume sistólico final, quando comparados com o grupo não hipertófico. O volume sistólico final é o volume de sangue presente em cada um dos ventrículos ao final de uma sístole. Quanto maior o seu valor, significa que mais sangue está restando no ventrículo, o que é indício de disfunção (Patrascu, 2013).

A família de fatores de troca de nucleotídeos guanina RasGEF1 possui três membros: Rasgef1a, Rasgef1b e Rasgef1c (Epting *et al.*, 2007). Na literatura, poucos são os estudos que investigam a expressão gênica ou função dessas moléculas (Yaman *et al.*, 2009; Ng *et al.*, 2016; Ng *et al.*, 2017). Neste trabalho demonstramos que o Rasgef1b é o GEF de expressão dominante no tecido cardíaco e, mais especificamente, em cardiomiócitos, sendo os níveis de mRNA basal de RasGEF1b >RasGEF1c >RasGEF1a. De maneira interessante, grande contribuição dos altos níveis do transcrito de RasGEF1b no coração é proveniente do cardiomiócito, evidenciado pelo valores de abundância relativa de mRNA, que foram semelhantes entre coração e cardiomiócitos. A predominância de Rasgef1b sobre RasGEF1a e RasGEF1c também foi observada em diferentes macrófagos murinos derivados de medula óssea ou peritoneais (Silva *et al.*, manuscrito em preparação).

Ao analisar os níveis de mRNA dos membros de RasGEF1 no coração dos animais RasGEF1b(Cm)-KO, observamos que a estratégia de recombinação foi

eficiente, com um percentual de deleção de aproximadamente 83%. Comparando a expressão dos três membros da família RasGEF1 em animais RasGEF1b(Cm)-KO, não foi observado um aumento dos níveis de mRNA de RasGEF1a ou RasGEF1c devido a redução de RasGEF1b, sugerindo que não há um mecanismo compensatório entre os membros da família RasGEF1.

Na literatura há diversos trabalhos que demonstram o envolvimento de cardiomiócitos na resposta inflamatória deflagrada por *T. cruzi* (Machado *et al.*, 2000; Petersen e Burleigh, 2003; Machado *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, 2008; Goldenberg *et al.*, 2009; Calvet *et al.*, 2016). Em nosso modelo, um resultado intrigante ressaltou ainda mais a importância destas células na resposta imune ao *T. cruzi*, além de, obviamente, reforçar um potencial papel do RasGEF1b nestas células. Camundongos RasGEF1b(Cm)-KO não apresentaram maior susceptibilidade à infecção mas mostraram-se parcialmente ineficientes em controlar a multiplicação do parasito no sangue, revelado por um atraso de dois dias no pico da parasitemia

O inesperado perfil parasitêmico dos animais RasGEF1b(Cm)-KO suscitou questões importantes no contexto da participação destas células no controle da replicação do parasito no sangue. Machado e colaboradores (2000) mostraram que o cardiomiócito infectado por *T. cruzi* é capaz de expressar citocinas como Tnf, Il-1 $\beta$  e iNos, e quimiocinas como Ccl2, Ccl5, Cxcl-1, Cxcl2, Cxcl10. Além disso, estas células produzem NO *in vitro* em resposta à Ifn- $\gamma$ , Il-1 $\beta$  ou Tnf, o que indica um papel destas células no controle da multiplicação do parasito (Machado *et al.* 2000). O mesmo grupo demonstrou ainda que, em sinergismo com Ifn- $\gamma$  e Tnf, o *T. cruzi* induz expressão ainda de Ccl3 e Ccl4 (Machado *et al.*, 2008), mostrando que o cardiomiócito é capaz de produzir diversos mediadores inflamatórios importantes também para o recrutamento de leucócitos para o tecido cardíaco. Outra citocina envolvida na resposta ao *T. cruzi* em cardiomiócitos é o Tgf- $\beta$ , que atua contribuindo para a multiplicação e diferenciação do parasito no citoplasma destas células, sendo também crucial na patogênese da cardiomiopatia chagásica (Waghabi, *et al.*, 2005a,b). Observações preliminares de estudos com os animais RasGEF1b(Cm)-KO infectados com *T. cruzi* indicaram que, no 11<sup>o</sup> dpi, parece haver uma elevação nos níveis de Ccl2 e Tgf- $\beta$ 1 no coração destes animais comparados com WT. No entanto, os dados são ainda incipientes para que seja sugerido algum papel de RasGEF1b na produção daquelas citocinas por cardiomiócitos.

A capacidade do cardiomiócito de responder a infecção por meio da produção de citocinas e liberação de todos esses mediadores abre caminhos para uma maior

investigação sobre o possível papel do RasGEF1b em cardiomiócitos na resposta à infecção pelo *T. cruzi*. Estas informações podem contribuir de maneira singular para os estudos sobre cardiomiopatia chagásica.

Até o presente momento não havia estudos que tenham investigado a função do RasGEF1b durante a infecção pelo *T. cruzi*. Utilizando animais geneticamente modificados com deficiência total ou tecido-específica para este gene, pudemos notar que o uso de modelos nocautes condicionais abre uma interessante linha de abordagem experimental para verificar a função de moléculas em células específicas, sem que haja a influência das conseqüências da perda de função em outros tecidos. Esse tipo de estudo é inovador, principalmente quando a molécula em estudo ainda não tem uma função claramente estabelecida. Neste estudo, além de revelar a participação de RasGEF1b durante a resposta imune ao *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção, nós geramos uma nova linhagem de camundongos com a deleção cardiomiócito-específica de RasGEF1b, uma importante ferramenta para o estudo deste gene na fisiologia cardíaca em condições normais ou patológicas.

## **7. Conclusões**

Os estudos conduzidos com camundongos nocautes completos ou condicionais hematopoiéticos para RasGEF1b mostram que esta molécula, durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, não é necessária no controle sistêmico de parasitos, bem como na sobrevivência dos animais. Por outro lado, RasGEF1b é importante para regulação da produção de Ifn- $\gamma$  e Il-6, provavelmente atuando de maneira célula-específica.

Ainda, foram gerados camundongos nocautes condicionais cardíacos, com a deleção de RasGEF1b em cardiomiócitos. No tecido cardíaco, RasGEF1b é o membro da família RasGEF1 mais abundante. Supreendentemente, o papel potencialmente desempenhado por RasGEF1b em cardiomiócitos impacta no controle de parasitos circulantes.

## 8. Referências bibliográficas

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp Parasitol**, v. 84, n. 2, p. 231-44, Nov 1996. ISSN 0014-4894. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8932773> >.

ADESSE, D. et al. Transcriptomic signatures of alterations in a myoblast cell line infected with four distinct strains of Trypanosoma cruzi. **Am J Trop Med Hyg**, v. 82, n. 5, p. 846-54, May 2010. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20439965> >.

AGAH, R. et al. Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo. **J Clin Invest**, v. 100, n. 1, p. 169-79, Jul 1997. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202069> >.

AKIRA, S. The role of IL-18 in innate immunity. **Curr Opin Immunol**, v. 12, n. 1, p. 59-63, Feb 2000. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10679398> >.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, p. 499-511, Jul 2004. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15229469> >.

ALIBERTI, J. C. et al. Interleukin-12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect Immun**, v. 64, n. 6, p. 1961-7, Jun 1996. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8675294> >.

ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from Trypanosoma cruzi: structural and functional analyses. **J Leukoc Biol**, v. 70, n. 4, p. 467-77, Oct 2001. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11590183> >.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 10, p. 819-23, Oct 2005. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16175174> >.

ANDRADE, W. A. et al. Early endosome localization and activity of RasGEF1b, a toll-like receptor-inducible Ras guanine-nucleotide exchange factor. **Genes Immun**, v. 11, n. 6, p. 447-57, Sep 2010. ISSN 1476-5470. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20090772> >.

ANDRADE, Z. A.; SILVA, H. R. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 4, p. 521-2, 1995 Jul-Aug 1995. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8551957> >.

ANTÚNEZ, M. I.; CARDONI, R. L. IL-12 and IFN-gamma production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Immunol Lett**, v. 71, n. 2, p. 103-9, Feb 2000. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10714437> >.

ARANTES, R. M.; NOGUEIRA, A. M. Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. **Cell Tissue Res**, v. 290, n. 1, p. 61-9, Oct 1997. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9377643> >.

ARAÚJO-JORGE, T. C. et al. Implication of transforming growth factor-beta1 in Chagas disease myocardopathy. **J Infect Dis**, v. 186, n. 12, p. 1823-8, Dec 2002. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12447769> >.

BAFICA, A. et al. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 177, n. 6, p. 3515-9, Sep 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951309> >.

BARROSO, A. et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor Modulates Production of Cytokines and Reactive Oxygen Species and Development of Myocarditis during *Trypanosoma cruzi* Infection. **Infect Immun**, v. 84, n. 10, p. 3071-82, 10 2016. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27481250> >.

BARTHOLOMEU, D. C. et al. Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, v. 181, n. 2, p. 1333-44, Jul 2008. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18606688> >.

BASTOS, K. R. et al. Role of endogenous IFN-gamma in macrophage programming induced by IL-12 and IL-18. **J Interferon Cytokine Res**, v. 27, n. 5, p. 399-410, May 2007. ISSN 1079-9907. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17523872> >.

BONNET, C. et al. Microdeletion at chromosome 4q21 defines a new emerging syndrome with marked growth restriction, mental retardation and absent or severely delayed speech. **J Med Genet**, v. 47, n. 6, p. 377-84, Jun 2010. ISSN 1468-6244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20522426> >.

BOS, J. L.; REHMANN, H.; WITTINGHOFER, A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. **Cell**, v. 129, n. 5, p. 865-77, Jun 2007. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17540168> >.

BRENER, Z. [The therapeutic activity of furaltadone, furazolidone and furadantine in experimental infection of the mouse by "Trypanosoma cruzi"]. **Hospital (Rio J)**, v. 60, p. 947-51, Dec 1961. ISSN 0018-5469. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13872812> >.

\_\_\_\_\_. (COMPARATIVE STUDIES OF DIFFERENT STRAINS OF TRYPANOSOMA CRUZI.). **Ann Trop Med Parasitol**, v. 59, p. 19-26, Mar 1965. ISSN 0003-4983. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14297351> >.

\_\_\_\_\_. Biology of Trypanosoma cruzi. **Annu Rev Microbiol**, v. 27, p. 347-82, 1973. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4201691> >.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**, v. 55, n. 4, p. 611-22, Apr 2009. ISSN 1530-8561. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246619> >.

CAETANO, B. C. et al. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with Trypanosoma cruzi. **J Immunol**, v. 187, n. 4, p. 1903-11, Aug 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21753151> >.

CALVET, C. M. et al. TGF- $\beta$  receptor type II costameric localization in cardiomyocytes and host cell TGF- $\beta$  response is disrupted by Trypanosoma cruzi infection. **Parasitology**, v. 143, n. 6, p. 704-15, 05 2016. ISSN 1469-8161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26996782> >.

CAMPOS, M. A. et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **J Immunol**, v. 167, n. 1, p. 416-23, Jul 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11418678> >.

\_\_\_\_\_. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with Trypanosoma cruzi in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. **J Immunol**, v. 172, n. 3, p. 1711-8, Feb 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734753> >.

CAPECCHI, M. R. Altering the genome by homologous recombination. **Science**, v. 244, n. 4910, p. 1288-92, Jun 1989a. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2660260> >.

\_\_\_\_\_. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. **Trends Genet**, v. 5, n. 3, p. 70-6, Mar 1989b. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2660363> >.

\_\_\_\_\_. Targeted gene replacement. **Sci Am**, v. 270, n. 3, p. 52-9, Mar 1994. ISSN 0036-8733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8134827> >.

CARDILLO, F. et al. Regulation of Trypanosoma cruzi infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect Immun**, v. 64, n. 1, p. 128-34, Jan 1996. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8557330> >.

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the Immune Response by Trypanosoma cruzi during Acute Infection. **Front Immunol**, v. 6, p. 659, 2015. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26834737> >.

CARON, E. Cellular functions of the Rap1 GTP-binding protein: a pattern emerges. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 3, p. 435-40, Feb 2003. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12508104> >.

CARRERA-SILVA, E. A. et al. Importance of TLR2 on hepatic immune and non-immune cells to attenuate the strong inflammatory liver response during Trypanosoma cruzi acute infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 11, p. e863, Nov 2010. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21072226> >.

CENCIG, S. et al. Parasitic loads in tissues of mice infected with Trypanosoma cruzi and treated with AmBisome. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 6, p. e1216, Jun 2011. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21738811> >.

CHIEN, Y. H. et al. Heteroduplex analysis of the RNA of clone 3 Moloney murine sarcoma virus. **J Virol**, v. 32, n. 3, p. 1028-32, Dec 1979. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/229257> >.

CRISPE, I. N. Isolation of mouse intrahepatic lymphocytes. **Curr Protoc Immunol**, v. Chapter 3, p. Unit 3.21, May 2001. ISSN 1934-368X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18432786> >.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of Trypanosoma cruzi in host tissue by real-time PCR. **Mol Biochem Parasitol**, v. 129, n. 1, p. 53-9, Jun 2003. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12798506> >.

DIAS, E. et al. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. **Circulation**, v. 14, n. 6, p. 1035-60, Dec 1956. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13383798> >.

DIAZGRANADOS, C. A. et al. Chagasic encephalitis in HIV patients: common presentation of an evolving epidemiological and clinical association. **Lancet Infect Dis**, v. 9, n. 5, p. 324-30, May 2009. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393962> >.

DOWER, N. A. et al. RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. **Nat Immunol**, v. 1, n. 4, p. 317-21, Oct 2000. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11017103> >.

DREXLER, H. G.; UPHOFF, C. C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. **Cytotechnology**, v. 39, n. 2, p. 75-90, Jul 2002. ISSN 0920-9069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003295> >.

DUTRA, W. O. et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunol**, v. 36, n. 8, p. 377-87, Aug 2014. ISSN 1365-3024. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24611805> >.

EBINU, J. O. et al. RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. **Science**, v. 280, n. 5366, p. 1082-6, May 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9582122> >.

\_\_\_\_\_. RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. **Blood**, v. 95, n. 10, p. 3199-203, May 2000. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807788> >.

EPTING, D. et al. Expression of rasgef1b in zebrafish. **Gene Expr Patterns**, v. 7, n. 4, p. 389-95, Feb 2007. ISSN 1567-133X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17239665> >.

ERDMANN, H.; BEHRENDTS, J.; HÖLSCHER, C. During acute experimental infection with the reticulotropic *Trypanosoma cruzi* strain Tulahuen IL-22 is induced IL-23-dependently but is dispensable for protection. **Sci Rep**, v. 6, p. 32927, Sep 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27650379> >.

ESPER, L. et al. Regulatory effects of IL-18 on cytokine profiles and development of myocarditis during *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect**, v. 16, n. 6, p. 481-90, Jun 2014. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24704475> >.

FERREIRA, L. R. et al. Identification and characterization of a novel mouse gene encoding a Ras-associated guanine nucleotide exchange factor: expression in macrophages and myocarditis elicited by *Trypanosoma cruzi* parasites. **J Leukoc Biol**, v. 72, n. 6, p. 1215-27, Dec 2002. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12488504> >.

FRIEDEL, R. H. et al. Generating conditional knockout mice. **Methods Mol Biol**, v. 693, p. 205-31, 2011. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21080282> >.

GAO, B.; JEONG, W. I.; TIAN, Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. **Hepatology**, v. 47, n. 2, p. 729-36, Feb 2008. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18167066> >.

GAO, W.; PEREIRA, M. A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Int J Parasitol**, v. 32, n. 2, p. 167-70, Feb 2002. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11812493> >.

GOLDENBERG, R. C. et al. Transcriptomic alterations in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. **Microbes Infect**, v. 11, n. 14-15, p. 1140-9, Dec 2009. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19729072> >.

GOLGHER, D.; GAZZINELLI, R. T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. **Autoimmunity**, v. 37, n. 5, p. 399-409, Aug 2004. ISSN 0891-6934. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15621564> >.

GOTO, K. Basic and therapeutic relevance of endothelin-mediated regulation. **Biol Pharm Bull**, v. 24, n. 11, p. 1219-30, Nov 2001. ISSN 0918-6158. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11725953> >.

GRAEFE, S. E. et al. Genes from Chagas susceptibility loci that are differentially expressed in *T. cruzi*-resistant mice are candidates accounting for impaired immunity. **PLoS One**, v. 1, p. e57, Dec 2006. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183687> >.

GREEN, D. S.; YOUNG, H. A.; VALENCIA, J. C. Current prospects of type II interferon  $\gamma$  signaling and autoimmunity. **J Biol Chem**, v. 292, n. 34, p. 13925-13933, 08 2017. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28652404> >.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, n. 1, p. 131-8, Oct 1982. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7181105> >.

GUATIMOSIM, S. et al. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca(2+) current. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 280, n. 5, p. C1327-39, May 2001. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11287346> >.

GUPTA, S. et al. ROS signalling of inflammatory cytokines during Trypanosoma cruzi infection. **Adv Parasitol**, v. 76, p. 153-70, 2011. ISSN 2163-6079. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21884891> >.

HALL, A. B. et al. Requirements for Vav guanine nucleotide exchange factors and Rho GTPases in FcγR- and complement-mediated phagocytosis. **Immunity**, v. 24, n. 3, p. 305-16, Mar 2006. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16546099> >.

HALL, B.; LIMAYE, A.; KULKARNI, A. B. Overview: generation of gene knockout mice. **Curr Protoc Cell Biol**, v. Chapter 19, p. Unit 19.12 19.12.1-17, Sep 2009. ISSN 1934-2616. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19731224> >.

HALL, B. S. et al. Cell-specific activation of nuclear factor-κB by the parasite Trypanosoma cruzi promotes resistance to intracellular infection. **Mol Biol Cell**, v. 11, n. 1, p. 153-60, Jan 2000. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10637298> >.

HAMANO, S. et al. WSX-1 is required for resistance to Trypanosoma cruzi infection by regulation of proinflammatory cytokine production. **Immunity**, v. 19, n. 5, p. 657-67, Nov 2003. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14614853> >.

HANCOCK, J. F. Ras proteins: different signals from different locations. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 5, p. 373-84, May 2003. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12728271> >.

HANKENSON, F. C. et al. Evaluation of tail biopsy collection in laboratory mice (Mus musculus): vertebral ossification, DNA quantity, and acute behavioral responses. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, v. 47, n. 6, p. 10-8, Nov 2008. ISSN 1559-6109. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19049247> >.

HE, J. et al. Mycoplasma genitalium-derived lipid-associated membrane proteins activate NF-κB through toll-like receptors 1, 2, and 6 and CD14 in a MyD88-dependent pathway. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, n. 12, p. 1750-7, Dec 2009. ISSN 1556-679X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19793902> >.

HORRAS, C. J.; LAMB, C. L.; MITCHELL, K. A. Regulation of hepatocyte fate by interferon- $\gamma$ . **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 22, n. 1, p. 35-43, Feb 2011. ISSN 1879-0305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21334249> >.

HÖLSCHER, C. et al. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in Trypanosoma cruzi-infected interleukin 10-deficient mice. **Infect Immun**, v. 68, n. 7, p. 4075-83, Jul 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858224> >.

JOHNSON, D. S.; CHEN, Y. H. Ras family of small GTPases in immunity and inflammation. **Curr Opin Pharmacol**, v. 12, n. 4, p. 458-63, Aug 2012. ISSN 1471-4973. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22401931> >.

JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Rev Mol Med**, v. 12, p. e29, Sep 2010. ISSN 1462-3994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20840799> >.

KANO, A. et al. IRF-1 is an essential mediator in IFN-gamma-induced cell cycle arrest and apoptosis of primary cultured hepatocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 257, n. 3, p. 672-7, Apr 1999. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10208842> >.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection. **Microbes Infect**, v. 12, n. 7, p. 511-7, Jul 2010. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20348008> >.

KNIGHT, B. et al. Interferon-gamma exacerbates liver damage, the hepatic progenitor cell response and fibrosis in a mouse model of chronic liver injury. **J Hepatol**, v. 47, n. 6, p. 826-33, Dec 2007. ISSN 0168-8278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17923165> >.

KUZIEL, W. A. et al. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 22, p. 12053-8, Oct 1997. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9342361> >.

KWAN, K. M. Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. **Genesis**, v. 32, n. 2, p. 49-62, Feb 2002. ISSN 1526-954X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11857777> >.

LANGERMANS, J. A. et al. IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous

tumor necrosis factor-alpha. **J Immunol**, v. 148, n. 2, p. 568-74, Jan 1992. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1729374> >.

LIN, L.; KNOWLTON, A. A. Innate immunity and cardiomyocytes in ischemic heart disease. **Life Sci**, v. 100, n. 1, p. 1-8, Mar 2014. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24486305> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

LOETSCHER, P. et al. Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. **FASEB J**, v. 8, n. 13, p. 1055-60, Oct 1994. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7926371> >.

MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 6, p. 753-70, Nov 2012. ISSN 1863-2300. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23076807> >.

MACHADO, F. S. et al. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by Trypanosoma cruzi-infected cardiac myocytes. **Microbes Infect**, v. 10, n. 14-15, p. 1558-66, 2008 Nov-Dec 2008. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18951994> >.

MAGANTO-GARCIA, E. et al. Rab5 activation by Toll-like receptor 2 is required for Trypanosoma cruzi internalization and replication in macrophages. **Traffic**, v. 9, n. 8, p. 1299-315, Aug 2008. ISSN 1600-0854. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18445119> >.

MARIM, F. M. et al. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15263, Dec 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21179419> >.

MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109-23, Mar 2007. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17339569> >.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 8, p. 606-16, Aug 2005. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16056254> >.

MEDEIROS, M. M. et al. Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent proinflammatory and immunomodulatory properties of the glycoinositolphospholipid (GIPL) from *Trypanosoma cruzi*. **J Leukoc Biol**, v. 82, n. 3, p. 488-96, Sep 2007. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17540734> >.

MEIRELLES, M. N. et al. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocytes: new contributions regarding a better understanding of this interaction. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 149-52, 1999. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677703> >.

MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, C. et al. *Trypanosoma cruzi* induces strong IL-12 and IL-18 gene expression in vivo: correlation with interferon-gamma (IFN-gamma) production. **Clin Exp Immunol**, v. 110, n. 3, p. 378-85, Dec 1997. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9409639> >.

MILES, M. A. Letter: Cloning *Trypanosoma cruzi*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 68, n. 3, p. 256, 1974. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4608041> >.

MING, M.; EWEN, M. E.; PEREIRA, M. E. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. **Cell**, v. 82, n. 2, p. 287-96, Jul 1995. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7628017> >.

MUKHERJEE, S. et al. Role of vasoactive mediators in the pathogenesis of Chagas' disease. **Front Biosci**, v. 8, p. e410-9, May 2003. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12700081> >.

MUKHERJEE et al. Alterations in myocardial gene expression associated with experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Genomics**, v. 91, n. 5, p. 423-32, May 2008. ISSN 1089-8646. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18343633> >.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **J Clin Invest**, v. 79, n. 2, p. 319-26, Feb 1987. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3543052> >.

NG, W. L. et al. Inducible RasGEF1B circular RNA is a positive regulator of ICAM-1 in the TLR4/LPS pathway. **RNA Biol**, v. 13, n. 9, p. 861-71, Sep 2016. ISSN 1555-8584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27362560> >.

OLIVEIRA, A. C. et al. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance

to infection with *T. cruzi*. **J Immunol**, v. 173, n. 9, p. 5688-96, Nov 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494520> >.

ORGANIZATION, W. H. **A global brief on vector-borne diseases**. Switzerland: World Health Organization: 56 p. 2014.

PAIVA, C. N. et al. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **J Leukoc Biol**, v. 86, n. 5, p. 1239-46, Nov 2009. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19641038> >.

PATRASCU, N. Assessment of Systolic and Diastolic Cardiac Function beyond Traditional Markers in Hypertensive Patients. Role of Cardiac Reserve. **Maedica (Buchar)**, v. 8, n. 2, p. 214-9, Jun 2013. ISSN 1841-9038. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24371488> >.

PETERSEN, C. A.; BURLEIGH, B. A. Role for interleukin-1 beta in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Infect Immun**, v. 71, n. 8, p. 4441-7, Aug 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12874323> >.

PINTO, P. L. et al. Life cycle of *Trypanosoma cruzi* (Y strain) in mice. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo**, v. 54, n. 5, p. 141-6, 1999 Sep-Oct 1999. ISSN 0041-8781. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10788834> >.

PONCE, N. E. et al. Toll-like receptor-2 and interleukin-6 mediate cardiomyocyte protection from apoptosis during *Trypanosoma cruzi* murine infection. **Med Microbiol Immunol**, v. 201, n. 2, p. 145-55, May 2012. ISSN 1432-1831. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21984337> >.

QUILLIAM, L. A.; REBHUN, J. F.; CASTRO, A. F. A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 71, p. 391-444, 2002. ISSN 0079-6603. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12102558> >.

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

RIBEIRO, A. L. et al. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nat Rev Cardiol**, v. 9, n. 10, p. 576-89, Oct 2012. ISSN 1759-5010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847166> >.

ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. M.; RIBEIRO, A. L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 5, n. 4, p. 727-43, Aug 2007. ISSN 1744-8336. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17678433> >.

RODRIQUES COURA, J.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, Jan 2002. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11992141> >.

ROFFÊ, E. et al. Role of CCL3/MIP-1alpha and CCL5/RANTES during acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Microbes Infect**, v. 12, n. 8-9, p. 669-76, Aug 2010. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20452453> >.

ROGGERO, E. et al. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. **Clin Exp Immunol**, v. 128, n. 3, p. 421-8, Jun 2002. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12067296> >.

ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. **Curr Opin Microbiol**, v. 3, n. 4, p. 395-403, Aug 2000. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10972501> >.

ROTTENBERG, M. et al. Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Scand J Immunol**, v. 28, n. 5, p. 573-82, Nov 1988. ISSN 0300-9475. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2463664> >.

ROTTENBERG, M. E. et al. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infect Immun**, v. 61, n. 12, p. 5129-33, Dec 1993. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8225589> >.

SALES JUNIOR, P. A. et al. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. **Am J Trop Med Hyg**, v. 97, n. 5, p. 1289-1303, Nov 2017. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29016289> >.

SALOMONE, O. A. et al. High plasma immunoreactive endothelin levels in patients with Chagas' cardiomyopathy. **Am J Cardiol**, v. 87, n. 10, p. 1217-20; A7, May 2001. ISSN 0002-9149. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11356406> >.

SANTIAGO, H. C. et al. 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, n. 12, p. 8165-72, Dec 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339555> >.

SARDINHA, L. R. et al. Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**, v. 74, n. 4, p. 2031-42, Apr 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16552032> >.

SAUER, B.; HENDERSON, N. Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic genome by the Cre recombinase. **New Biol**, v. 2, n. 5, p. 441-9, May 1990. ISSN 1043-4674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2288914> >.

SCHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 5, p. 878-88, May 2011. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296109> >.

SCHRODER, K. et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **J Leukoc Biol**, v. 75, n. 2, p. 163-89, Feb 2004. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14525967> >.

SCHULZ, D. J.; GOAILLARD, J. M.; MARDER, E. E. Quantitative expression profiling of identified neurons reveals cell-specific constraints on highly variable levels of gene expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 32, p. 13187-91, Aug 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17652510> >.

SERBINA, N. V. et al. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 421-52, 2008. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18303997> >.

SHINAGAWA, T. et al. Apoptosis in cultured rat hepatocytes: the effects of tumour necrosis factor alpha and interferon gamma. **J Pathol**, v. 165, n. 3, p. 247-53, Nov 1991. ISSN 0022-3417. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1762032> >.

SILVA, G. K. et al. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 184, n. 3, p. 1148-52, Feb 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042586> >.

SILVA, J. S. et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J Exp Med**, v. 175, n. 1, p. 169-74, Jan 1992. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1730915> >.

SILVA, J. S. et al.. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect Immun**, v. 63, n. 12, p. 4862-7, Dec 1995. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7591147> >.

STAHL, P. et al. *Trypanosoma cruzi* evades the protective role of interferon-gamma-signaling in parasite-infected cells. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110512, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25340519> >.

STAROBINAS, N. et al. Is TNF alpha involved in early susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected C3H/He mice? **Res Immunol**, v. 142, n. 2, p. 117-22, Feb 1991. ISSN 0923-2494. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1907750> >.

TAKAI, Y.; SASAKI, T.; MATOZAKI, T. Small GTP-binding proteins. **Physiol Rev**, v. 81, n. 1, p. 153-208, Jan 2001. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152757> >.

TALVANI, A. et al. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infect**, v. 2, n. 8, p. 851-66, Jul 2000. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10962268> >.

TANG, S. et al. RasGRP3 limits Toll-like receptor-triggered inflammatory response in macrophages by activating Rap1 small GTPase. **Nat Commun**, v. 5, p. 4657, Aug 2014. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25118589> >.

TANOWITZ, H. B. et al. Role of endothelin 1 in the pathogenesis of chronic chagasic heart disease. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, p. 2496-503, Apr 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15784596> >.

TANOWITZ, H. B. Parasitic diseases of the heart II: Toxoplasmosis and other protozoan and helminthic diseases. **Cardiovasc Pathol**, v. 1, n. 2, p. 97-106, 1992 Apr-Jun 1992. ISSN 1054-8807. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25990121> >.

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

TARLETON, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 4, p. 430-4, Aug 2007. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651955> >.

TEIXEIRA, A. R. et al. Chagas disease. **Postgrad Med J**, v. 82, n. 974, p. 788-98, Dec 2006. ISSN 1469-0756. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17148699> >.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 6, p. 262-5, Jun 2002. ISSN 1471-4922. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12036740> >.

TIMENETSKY, J. et al. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 7, p. 907-14, Jul 2006. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16862282> >.

TOMLINSON, S. et al. The induction of Trypanosoma cruzi trypomastigote to amastigote transformation by low pH. **Parasitology**, v. 110 ( Pt 5), p. 547-54, Jun 1995. ISSN 0031-1820. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7541124> >.

TORRICO, F. et al. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute Trypanosoma cruzi infection in mice. **J Immunol**, v. 146, n. 10, p. 3626-32, May 1991. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1902858> >.

TSUTSUI, H. et al. IL-18 accounts for both TNF-alpha- and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice. **J Immunol**, v. 159, n. 8, p. 3961-7, Oct 1997. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9378984> >.

VAN VOORHIS, W. C. Coculture of human peripheral blood mononuclear cells with Trypanosoma cruzi leads to proliferation of lymphocytes and cytokine production. **J Immunol**, v. 148, n. 1, p. 239-48, Jan 1992. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1727869> >.

VELOSO, V. M. et al. Trypanosoma cruzi: blood parasitism kinetics and their correlation with heart parasitism intensity during long-term infection of Beagle dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 6, p. 528-34, Sep 2008. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949320> >.

VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect Immun**, v. 62, n. 11, p. 5177-82, Nov 1994. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7523307> >.

VIGIL, D. et al. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 12, p. 842-57, Dec 2010. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21102635> >.

VOGEL, G. Nobel Prizes. A knockout award in medicine. **Science**, v. 318, n. 5848, p. 178-9, Oct 2007. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17932258> >.

VOJTEK, A. B.; DER, C. J. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. **J Biol Chem**, v. 273, n. 32, p. 19925-8, Aug 1998. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9685325> >.

WAGHABI, M. C. et al. Increased Trypanosoma cruzi invasion and heart fibrosis associated with high transforming growth factor beta levels in mice deficient in alpha(2)-macroglobulin. **Infect Immun**, v. 70, n. 9, p. 5115-23, Sep 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183561> >.

WAGHABI et al.. Uptake of host cell transforming growth factor-beta by Trypanosoma cruzi amastigotes in cardiomyocytes: potential role in parasite cycle completion. **Am J Pathol**, v. 167, n. 4, p. 993-1003, Oct 2005. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16192635> >.

WAGHABI et al. Activation of transforming growth factor beta by Trypanosoma cruzi. **Cell Microbiol**, v. 7, n. 4, p. 511-7, Apr 2005. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15760451> >.

WATANABE COSTA, R.; DA SILVEIRA, J. F.; BAHIA, D. Interactions between Trypanosoma cruzi Secreted Proteins and Host Cell Signaling Pathways. **Front Microbiol**, v. 7, p. 388, 2016. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27065960> >.

WATSON, C. et al. IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes. **Clin Exp Immunol**, v. 105, n. 1, p. 112-9, Jul 1996. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8697617> >.

WEIJZEN, S.; VELDERS, M. P.; KAST, W. M. Modulation of the immune response and tumor growth by activated Ras. **Leukemia**, v. 13, n. 4, p. 502-13, Apr 1999. ISSN 0887-6924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10214854> >.

WENNERBERG, K.; ROSSMAN, K. L.; DER, C. J. The Ras superfamily at a glance. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 5, p. 843-6, Mar 2005. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731001> >.

YAMAN, E. et al. RasGEF1A and RasGEF1B are guanine nucleotide exchange factors that discriminate between Rap GTP-binding proteins and mediate Rap2-specific nucleotide exchange. **FEBS J**, v. 276, n. 16, p. 4607-16, Aug 2009. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19645719> >.

ZUO, L. L.; WU, Y. M.; YOU, X. X. Mycoplasma lipoproteins and Toll-like receptors. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 10, n. 1, p. 67-76, Jan 2009. ISSN 1673-1581. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19198025> >.

## ANEXO I

### Certificado de aprovação de projeto pelo CEUA



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

#### **CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 69 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Papel do fator de troca de guanina RasGEF1B durante a infecção por Trypanosoma cruzi", que tem como responsável Aristobolo M. Silva, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 23/10/2014. Este certificado espira-se em 23/10/2019.

#### **CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 69 / 2014, related to the Project entitled "Role of guanine exchange factor RasGEF1B during Trypanosoma cruzi infection", under the supervision of Aristobolo M. Silva, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 23/10/2014. This certificates expires in 23/10/2019.

Cleuza Maria de Faria Rezende  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 23/10/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)