

Patrícia Pereira Dias

**INFLUÊNCIA DO TRÁFEGO INTRACELULAR DO *Trypanosoma cruzi*
E RESPOSTA CELULAR À INFECÇÃO NO DESENVOLVIMENTO
INTRACELULAR DO PARASITO**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro/2017

Patrícia Pereira Dias

**INFLUÊNCIA DO TRÁFEGO INTRACELULAR DO *Trypanosoma cruzi*
NA RESPOSTA CELULAR À INFECÇÃO E DESENVOLVIMENTO
INTRACELULAR DO PARASITO**

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador (a): Dra. Luciana de Oliveira Andrade

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro/2017

*A minha mamãe querida;
A minha eterna amiga;
Com quem posso sempre contar!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, porque sem Ele, com toda a certeza não teria chegado onde cheguei. Por seu amor e cuidado infinitos!

Aos meus pais, Marlene e Carlos, pelas preces, apoio e carinho. Por saber que posso sempre contar com eles.

Ao meu marido, Fernando, por estar ao meu lado durante esta longa jornada.

Ao meu irmão, Fabinho, por toda ajuda e apoio.

Aos meus familiares que sempre torceram e torcem pelo meu sucesso.

À minha orientadora, Profa. Luciana, por sua exigência, apoio e presença constante, o que com certeza me fez uma pessoa melhor.

À Profa. Juliana, por todo o apoio e disposição na coorientação deste projeto.

Aos queridos amigos que fiz durante estes 4 anos, mas de modo especial a todos aqueles que passaram pelo LBCM. Não posso deixar de agradecer a Natália, companheira eterna nos momentos bons, ruins, de discussões de resultados, bem como de auxílio em experimentos e também nas horas de almoço. A Rhyanne, que com seu jeito doce e compenetrado me ajudou a construir este trabalho. A Thalita, por querer sempre compartilhar um pouco de sua vida comigo e assim me fazer sentir que sou uma amiga constante. A Lívia, Luísa, Anny, Victor, Maísa, Bruno e aos agregados do coração, Heli e Wesley, foi um prazer imenso conhecer e estar com vocês.

Ao Quarteto UFMG, Katita, Lulu e Thaís, amigas do coração que ajudaram a tornar mais leve e agradável esta jornada, além de sempre estarem a disposição para os momentos de desabafo.

Aos que me ajudaram na realização de experimentos, obrigada Bárbara, Lucía, Damían, Rafael e Anderson.

A todos do CEINBIO (*Universidad de la República – Uruguay*), por me receberem com tanto carinho e pela ajuda em cada experimento.

À Profa Fernanda Gadelha, que nos auxiliou muitíssimo na obtenção de importantes resultados e claro, contribuiu imensamente para o desfecho deste trabalho.

Agradeço também ao CEBIO, em especial ao Gilmar, por sempre conseguir os animais que precisava.

Aos alunos do Professor Carlos Renato, em especial a Ceres, bem como à Grazi juntamente com a Profa Leda Vieira, que tão gentilmente auxiliaram na realização de vários experimentos.

Aos irmãos queridos da Igreja Adventista do Sétimo Dia do Novo Glória pelas orações constantes.

A todos os amigos e funcionários da UFMG que passaram por minha vida durante estes 4 anos.

Às agências de fomento, pelo financiamento deste trabalho.

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), apresenta um curso clínico variável, variando desde casos assintomáticos até formas mais graves com comprometimento cardíaco, digestivo ou cardio-digestivo. Estudos prévios utilizando duas populações clonais de *T. cruzi*, Col1.7G2 (*T. cruzi* I) e JG (*T. cruzi* II) demonstraram que houve distribuição tecidual diferencial desses parasitos durante a infecção em camundongos BALB/c, com predominância de JG no coração. A maior adaptação de JG pelo músculo cardíaco foi posteriormente confirmada por estudos de infecção *in vitro* em culturas de cardiomiócitos primários de camundongo. Dessa forma, a seleção por um tecido específico é resultado primariamente da interação direta entre parasito e célula hospedeira, sem a interferência direta do sistema imune. Adicionalmente, observou-se que a seleção é dependente não apenas da taxa de invasão celular, mas principalmente da taxa de multiplicação intracelular do parasito. Pouco se sabe sobre os mecanismos que determinam essa seleção tecidual. A célula hospedeira quando infectada responde a esta infecção produzindo vários fatores tais como, espécies reativas de oxigênio, citocinas, entre outros. De acordo com dados anteriores da literatura, mostramos que a cepa JG apresenta uma maior taxa de multiplicação intracelular quando comparada com clone Col1.7G2 em cardiomiócitos. Também mostramos que os cardiomiócitos em cultura respondem à infecção com produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e que os níveis de ROS são maiores nas culturas infectadas com JG, enquanto que JG apresenta menos enzimas anti-oxidantes. Adicionalmente, a inibição do estresse oxidativo interfere com a taxa de multiplicação intracelular de JG, mas não Col1.7G2. ROS por sua vez mostrou-se capaz de induzir níveis maiores de moléculas sinalizadoras em JG, como cálcio e ânion superóxido, os quais podem estar contribuindo para indução da maior multiplicação intracelular desta população clonal de *T. cruzi*. Os dados aqui apresentados sugerem que certos níveis de ROS podem ser importantes para a sinalização e indução da multiplicação intracelular do parasito.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; cardiomiócitos; espécies reativas de oxigênio

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, presents a variable clinical course, varying from asymptomatic to serious debilitating pathologies with cardiac, digestive or cardio-digestive impairment. Previous studies using two clonal *T. cruzi* populations, Col1.7G2 (*T. cruzi* I) and JG (*T. cruzi* II) demonstrated that there was a differential tissue distribution of these parasites during infection in BALB/c mice, with predominance of JG in the heart. Increased JG adaptation by cardiac muscle was later confirmed by *in vitro* infection studies in primary cardiomyocyte cultures. Thus, selection may primarily be a result of the direct interaction between parasite and host cell. Additionally, it was observed that the selection is dependent not only on parasite invasion, but mainly on the intracellular multiplication rate of the parasite. Little is known about the mechanisms that determine this tissue selection. The host cell when infected responds to this infection producing several factors such as, reactive oxygen species, cytokines, among others. In agreement with previous data from the literature we show here that JG strain presents a higher intracellular multiplication rate when compared to Col1.7G2 clone. We also showed that cardiomyocytes in culture respond to infection with production of reactive oxygen species (ROS) and that the levels of ROS are higher in cultures infected with JG, while JG presents less anti-oxidant enzymes. Additionally, inhibition of oxidative stress interferes with intracellular multiplication rate of JG, but not Col1.7G2. ROS, was able to induce higher levels of signaling molecules in JG, such as calcium and anion superoxide, which may be contributing to the faster intracellular multiplication of this clonal population of the parasite. Data presented here suggest that certain levels of ROS might be important for signaling and induction of parasite intracellular multiplication.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; cardiomyocytes; reactive oxygen species

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 – Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 29 |
| FIGURA 2 – Modelo de invasão celular pelo <i>T. cruzi</i> mediada por lesão e reparo de membrana plasmática | 35 |
| FIGURA 3 – Esquema mostrando as fontes de ROS, defesas antioxidantes e efeitos biológicos subsequentes dependentes do nível de produção de ROS. | 38 |
| FIGURA 4 – Quantificação das taxas de invasão e multiplicação intracelular de Col1.7G2 e JG em culturas primárias de cardiomiócitos..... | 55 |
| FIGURA 5 – Taxa de escape do vacúolo parasitóforo, das populações clonais de <i>T. cruzi</i> , Col1.7G2 e JG, em culturas primárias de cardiomiócitos de camundongo neonato BALB/c | 57 |
| FIGURA 6 – Avaliação da produção das citocinas IL-4, IL-10, TNF- α e IL-6 no sobrenadante de culturas primárias de cardiomiócitos de camundongos neonatos BALB/c infectadas, ao longo de 96 horas de infecção, com Col1.7G2 ou JG | 59 |
| FIGURA 7 – Fluorescência relativa de CM-H2DCFDA oxidada presente em culturas primárias de cardiomiócitos de camundongos neonatos BALB/c, 48 e 72 horas após a infecção com Col1.7G2 ou JG..... | 61 |
| FIGURA 8 – Índice de controle respiratório (ICR) em culturas primárias de cardiomiócitos de neonatos BALB/c infectadas com diferentes concentrações das duas populações clonais de <i>T. cruzi</i> , Col1.7G2 e JG, 48 horas após a infecção | 63 |
| FIGURA 9 – Intensidade média de fluorescência obtida a partir da marcação de formas tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas das duas populações clonais de <i>T. cruzi</i> , Col1.7G2 e JG | 66 |
| FIGURA 10 – Crescimento de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio | 67 |
| FIGURA 11 – Intensidade média de fluorescência obtida a partir da marcação de formas epimastigotas das duas populações clonais de <i>T. cruzi</i> , Col1.7G2 e JG | 68 |
| FIGURA 12 – Intensidade média de fluorescência obtida a partir da marcação de formas amastigotas das duas populações de <i>T. cruzi</i> , Col1.7G2 e JG | 68 |
| FIGURA 13 – Quantificação das taxas de invasão e multiplicação intracelular de Col1.7G2 e JG em culturas primárias de cardiomiócitos de camundongos neonatos BALB/c, tratadas com catalase. | 70 |
| FIGURA 14 – Quantificação das taxas de invasão e multiplicação intracelular de Col1.7G2 e JG em culturas de cardiomiócitos humanos..... | 72 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 15 – Fluorescência relativa de CM-H2DCFDA oxidada presente em culturas de cardiomiócitos humanos derivadas de iPSCs, 48 horas após a infecção com Col1.7G2 ou JG..... | 74 |
| FIGURA 16 – Quantificação das taxas de invasão e multiplicação intracelular de Col1.7G2 e JG em culturas de cardiomiócitos humanos tratadas com catalase..... | 76 |
| FIGURA 17 – Quantificação das taxas de multiplicação intracelular de Col1.7G2 e JG em culturas de fibroblastos embrionários de camundongo (WTCL3) | 78 |
| FIGURA 18 – Tratamento da forma epimastigota da cepa JG com H ₂ O ₂ , apresenta um aumento nos níveis de Ca ²⁺ intracelular. | 80 |
| FIGURA 19 – Produção de ânion superóxido e liberação de H ₂ O ₂ por formas epimastigotas de JG e Col1.7G2 antes e após o tratamento com H ₂ O ₂ | 82 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\cdot\text{OH}$ – radical hidroxil

8-oxo-dGTP – *8-Oxo-2'-deoxy-guanosine-5'-triphosphate*

Amplex® Red – *10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine*

APX – *Ascorbate Peroxidase*

ASM – *Acid sphingomyelinase*

BSA – *Bovine Serum Albumin*

Ca^{2+} – Cálcio

Catalase-PEG – Catalase-polietileno glicol

CBA – *Cytometric Bead Array*

CM-H₂DCFDA – *(5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester*

CPX – *Cytosolic Tryparedoxin Peroxidase*

Ct – *cycle threshold*

CTL – Controle

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DNA – *deoxyribonucleic acid*

dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DTU – *Discrete Typing Units*

Ed. – Editor

EDTA – Ethylenediamine Tetraacetic Acid

ELISA – *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

EPM – Erro Padrão da Média

FCCP – *Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone*

GPX – *Glutathione Peroxidase*

H9C2 – Mioblasto do coração de *Rattus norvegicus*

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HBSS – *Hank's Balanced Salt Solution*

HFF – *Human Foreskin Fibroblasts*

HIF-1 α – fator de transcrição induzível de hipoxia 1 α

HL-1 – células atriais de camundongo

HRP – *horseradish peroxidase*

ICR – Índice de Controle Respiratório

IFN γ – Interferon gama

IL-1 β – Interleucina-1 beta

IL-6 – Interleucina-6

iPSCs – células tronco pluripotentes humanas induzidas em cardiomiócitos

L-15 – meio Leibovitz

LAMP1 – *Lysosomal-associated membrane protein 1*

LIT – *Liver Infusion Triptose*

LLC-MK2 – células epiteliais de rim de macaco rhesus

MAP quinase/AP-1 – *mitogen-activated*

MHC – *Major Histocompatibility Complex*

MIF – Intensidade Média de Fluorescência

MitoSOX – *(3, 8-phenanthridine diamine, 5-(6-triphenylphosphonium hexyl)-5, 6-dihydro-6-phenyl*

MOI – multiplicidade de infecção

MPX – *Mitochondrial Tryparedoxin Peroxidase*

MutT – enzima envolvida no reparo de DNA

O $_2^{\cdot-}$ – radical ânion superóxido

ox MitoSOX – MitoSOX oxidado

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PBS/BSA – *Phosphate Buffered Saline + Bovine Serum Albumin*

PBS/BSA/Saponina – *Phosphate Buffered Saline + Bovine Serum Albumin + 0,5% de Saponina*

PBS $^{+/+}$ – *Phosphate Buffered Saline* enriquecido com cloreto de cálcio e cloreto de magnésio

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PFA – paraformaldeído

PPD – *p-Phenylenediamine*

qPCR – PCR quantitativa

RNA – *ribonucleic acid*

ROS – *Reactive Oxygen Species*

SFB – Soro Fetal Bovino

SOD – Superóxido Dismutase

T.A. – temperatura ambiente

TAU – *Triatomine Artificial Urine*

Tc – *Trypanosoma cruzi*

TGF- β – *Transforming Growth factor beta*

TNF α – *Tumor Necrosis Factor alpha*

UFR – *Unidades de Fluorescência Relativas*

UFTM – *Universidade Federal do Triângulo Mineiro*

VERO – *células epiteliais de rim de macaco verde africano*

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 27 |
| 1.1 O ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> | 28 |
| 1.2 A doença de Chagas | 29 |
| 1.3 O <i>Trypanosoma cruzi</i> | 31 |
| 1.4 Infecção celular pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> | 33 |
| 1.5 Resposta celular a infecção | 35 |
| 1.6 Justificativa..... | 40 |
| 1.7 Objetivos | 41 |
| 1.7.1 Geral..... | 41 |
| 1.7.2 Específicos | 41 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 2.1 Parasitos e tratamentos..... | 43 |
| 2.2 Culturas celulares e tratamentos | 44 |
| 2.3 Infecção celular | 46 |
| 2.4 Avaliação da taxa de invasão, escape do vacúolo e multiplicação intracelular do <i>T. cruzi</i> | 47 |
| 2.5 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por células infectadas..... | 48 |
| 2.6 Avaliação da taxa de respiração celular..... | 49 |
| 2.7 Quantificação de enzimas antioxidantes nas diferentes formas do ciclo de vida do parasito | 50 |
| 2.8 Dosagem de citocinas no sobrenadante de culturas de cardiomiócitos primários infectados por CBA (<i>Cytometric Bead Array</i>)..... | 51 |
| 2.9 Detecção dos níveis de expressão de mRNA para <i>Tgf-β1</i> | 51 |
| 2.10 Determinação da concentração de cálcio intracelular em parasitos..... | 52 |
| 2.11 Determinação da liberação de H ₂ O ₂ por parasitos | 52 |
| 2.12 Determinação da produção de superóxido em parasitos | 53 |
| 2.13 Análise estatística | 53 |
| 3 RESULTADOS | 54 |
| 3.1 JG apresenta um desenvolvimento intracelular maior em culturas de cardiomiócitos murinos..... | 54 |
| 3.2 O tempo de escape do vacúolo parasitóforo é semelhante para as duas populações de <i>T. cruzi</i> analisadas. | 56 |
| 3.3 Culturas de cardiomiócitos infectados com JG apresentam um aumento na produção de IL-6 quando comparado as culturas infectadas com Col1.7G2 | 58 |
| 3.4 Culturas de cardiomiócitos primários de camundongos infectadas com JG produzem mais ROS | 60 |
| 3.5 Maior disfunção mitocondrial em cardiomiócitos primários expostos a JG..... | 62 |
| 3.6 O clone Col1.7G2 apresenta uma maior quantidade de enzimas antioxidantes | 64 |
| 3.7 O tratamento com catalase compromete o desenvolvimento intracelular de JG em cardiomiócitos de camundongos | 69 |
| 3.8 Cardiomiócitos humanos apresentam um perfil de desenvolvimento intracelular de Col1.7G2 e JG semelhante ao observado para cardiomiócitos de camundongos..... | 71 |

| | |
|--|-----------|
| 3.9 Culturas de cardiomiócitos humanos infectadas com JG produzem mais ROS | 73 |
| 3.10 Tratamento com catalase compromete o desenvolvimento intracelular de JG em cardiomiócitos humanos | 75 |
| 3.11 Infecção em fibroblastos imortalizados de camundongo não gera estresse oxidativo e o perfil de crescimento intracelular é similar entre JG e Col1.7G2.77 | 77 |
| 3.12 Epimastigotas da cepa JG apresentam maiores níveis de Ca²⁺ intracelular após tratamento com H₂O₂ | 79 |
| 3.13 Epimastigotas da cepa JG apresentam maior produção O₂⁻ após tratamento com H₂O₂ | 81 |
| 4 DISCUSSÃO | 83 |
| 5 CONCLUSÃO | 91 |
| REFERÊNCIAS | 92 |

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, foi descoberta em 1909, pelo médico sanitário Carlos Chagas e, atualmente, cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo estão infectadas com o parasito, sendo que a maioria destas pessoas encontra-se na América Latina (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2016). No Brasil, as regiões nordeste, centro-oeste, sudeste e sul compõem áreas endêmicas para a doença de Chagas (COURA; DIAS, 2009). Estima-se que a cada ano 10 mil pessoas morram em decorrência dos sintomas da doença, além de mais de 25 milhões de pessoas estarem em situação de risco em adquirir a tripanossomíase americana (WHO, 2017a). O continente americano apresenta mais de 140 espécies do inseto vetor transmissor do parasito. Devido a este fato, a distribuição geográfica se dá primeiramente neste continente (WHO, 2015; DIAS *et al.*, 2016). A doença é transmitida ao homem, além de outros mamíferos, em condições naturais, por insetos pertencentes à família Reduviidae, comumente chamado de barbeiros (revisto por COURA; DIAS, 2009; ARAUJO; WANIEK; JANSEN, 2009). O inseto torna-se ativo a noite e, portanto, é quando entra em contato com o indivíduo. Durante o repasto sanguíneo o inseto elimina nas fezes a forma infectante, tripomastigota metacíclica. Os protozoários entram no organismo humano quando, por instinto, o indivíduo carrega as fezes contento os parasitos para o local da picada, ou para qualquer lugar na pele com lesão, ou mesmo para as mucosas de olhos ou boca (WHO, 2016). Apesar de um programa de controle de vetores em 2010 a taxa de incidência de transmissão vetorial ainda era de 29.000 casos ao ano (DIAS *et al.*, 2016). Além desta, existem outras formas de transmissão da doença de Chagas tais como, transfusão sanguínea, via oral, congênita, por meio de acidentes laboratoriais e transplante de órgãos, as quais tem se tornado importantes nos últimos anos (COURA; DIAS, 2009). Essas outras formas alternativas de transmissão permitiram que países onde a doença não é endêmica, pela ausência do inseto transmissor, como Canadá, França, Espanha, Suíça, Japão e Austrália, apresentassem casos de infecção com o *T. cruzi*, tornando a doença de Chagas um problema de saúde mundial (FLORIÁN SANZ *et al.*, 2005; SCHMUNIS, 2007; LESCURE *et al.*, 2008; MUÑOZ *et al.*, 2009; JACKSON *et al.*, 2010). A migração de pessoas infectadas para países onde a doença de Chagas não é endêmica se dá principalmente por fatores socioculturais e

políticos. Tais países devem discutir sobre os riscos e vulnerabilidade que estão sujeitas suas populações e desenvolver ações de controle da doença (DIAS *et al.*, 2016).

1.1 O ciclo de vida do *T. cruzi*

O ciclo de vida do *T. cruzi* se inicia quando o inseto vetor, o barbeiro, ao se alimentar do sangue do hospedeiro libera em suas fezes e urina a forma tripomastigota metacíclica do parasito, uma forma alongada e flagelada, infectiva para o hospedeiro vertebrado. Essa forma tripomastigota penetra no hospedeiro vertebrado através do local picada ou quando em contato com membranas mucosas e conjuntivas (Figura 1) (CHAGAS, 1909; TYLER; ENGMAN, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2006; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Uma vez dentro do organismo, a forma tripomastigota metacíclica pode invadir uma grande variedade de tipos celulares, incluindo células fagocíticas profissionais, como macrófagos teciduais, ou células fagocíticas não-profissionais, como células musculares estriadas e lisas, fibroblastos, dentre outras. Dentro da célula hospedeira, a forma tripomastigota se diferencia na forma amastigota (forma ovóide e sem flagelo), a qual se multiplica por muitas vezes por fissão binária, colonizando o interior celular. Após sucessivas divisões, a forma amastigota se diferencia novamente na forma tripomastigota, móvel, a qual rompe a célula hospedeira por causa de seu grande número e movimentação intensa. Uma vez fora da célula essas formas podem invadir células vizinhas ou cair na corrente sanguínea e infectar outras células do hospedeiro, causando lesões, principalmente em tecido musculares cardíacos e lisos (Figura 1) (CHAGAS, 1909; DVORAK; HYDE, 1973; TEIXEIRA *et al.*, 2006; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Ao fazer o repasto sanguíneo, o barbeiro ingere as formas tripomastigotas presentes no sangue do hospedeiro vertebrado. Uma vez no trato digestivo do hospedeiro invertebrado, barbeiro, a forma tripomastigota se transforma na forma epimastigota, uma forma flagelada e multiplicativa no vetor. As formas epimastigotas se multiplicam e migram para o intestino posterior do inseto, se diferenciando na forma tripomastigota metacíclica, que é eliminada nas fezes e urina durante o repasto sanguíneo, fechando assim o ciclo de transmissão do parasito (Figura 1) (CHAGAS, 1909; TYLER; ENGMAN, 2001; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

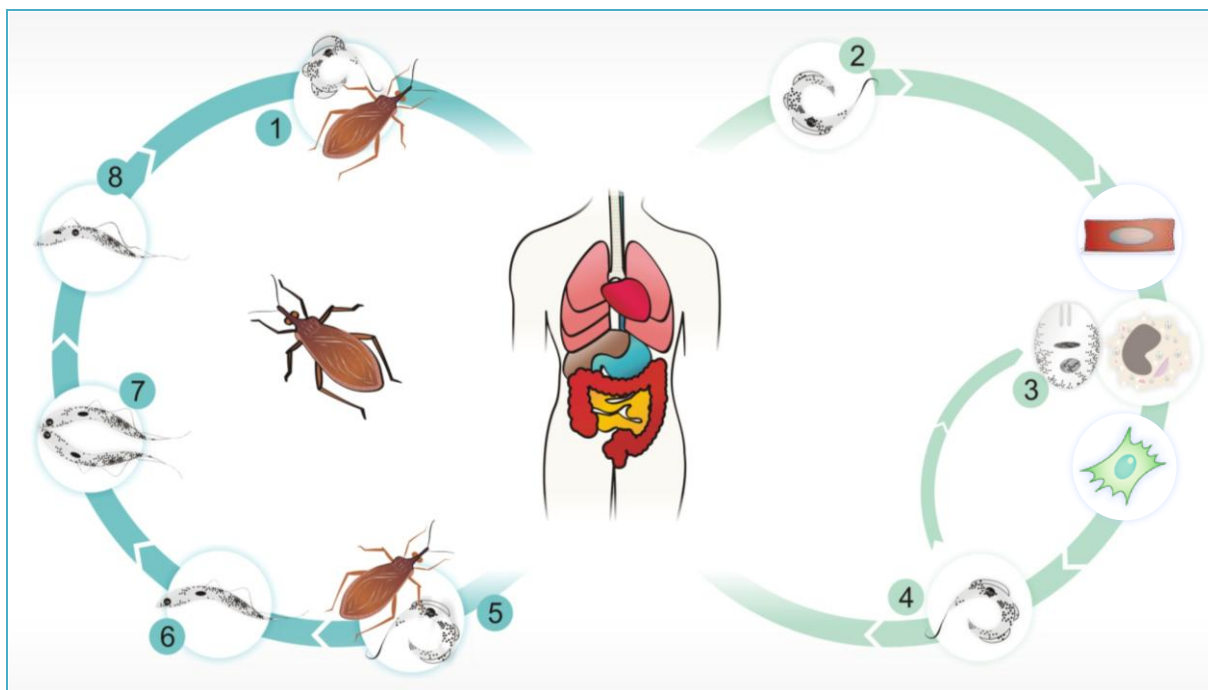


FIGURA 1 – Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. 1 – A forma tripomastigota metacíclica é liberada nas fezes, quando o inseto faz o repasto. 2 – O protozoário entra no hospedeiro vertebrado através da ferida ou mucosa, infectando as células; 3 – Dentro das células o tripomastigota se transforma em amastigota, que se reproduz por fissão binária; 4 – Amastigotas se tornam tripomastigotas, que são liberados no sangue e linfa, podendo infectar novas células; 5 – O tripomastigota livre no sangue é sugado pelo barbeiro; 6 – No hospedeiro invertebrado, barbeiro, o tripomastigota se transforma em epimastigota em seu intestino; 7 – Multiplicação do protozoário; 8 – A forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*, se transforma em tripomastigota metacíclica.

Fonte: Adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>, 2012 por Matheus Thomaz Nogueira Silva Lima.

1.2 A doença de Chagas

A infecção no homem é definida, por duas fases clínicas distintas. A fase aguda, correspondente ao período inicial da infecção, caracterizada por alta parasitemia e parasitismo tecidual, seguida da fase crônica da infecção, a qual persiste por toda a vida do hospedeiro e é caracterizada por menor parasitismo tecidual, e sanguíneo (PRATA, 2001). A infecção crônica tem curso clínico variável, podendo apresentar desde casos assintomáticos (forma indeterminada), até quadros clínicos graves com acometimento do coração (forma cardíaca) e/ou trato digestivo (megacólon ou megaesôfago – forma digestiva). Nos pacientes com acometimentos cardíacos e/ou digestivos, os sintomas podem aparecer entre 10 a 30 anos após a infecção inicial e são decorrentes da persistência do parasito em tecidos específicos,

como músculo cardíaco e/ou liso, com desenvolvimento de um processo inflamatório intenso e deletério para o órgão (DUTRA; GOLLOB; 2008).

É na fase aguda, que a administração da medicação disponível, benzonidazol ou nifurtimox pode levar a quase 100% de cura da doença. Contudo, a eficácia de ambos diminui com o passar do tempo em que a pessoa tenha sido infectada. O tratamento é indicado também para pessoas onde a infecção foi reativada, por exemplo, por imunossupressão, para crianças com infecção congênita e para pacientes durante o início da fase crônica (WHO, 2016). A identificação da fase aguda é muito rara, já que quando existem sintomas estes não são específicos. Portanto, quando em sua maioria há comprovação da infecção, o paciente se encontra já na fase crônica da doença, fase onde o tratamento medicamentoso disponível não é mais eficaz (WHO, 2017b; SALOMON, 2012).

A demonstração direta do parasito em hospedeiros mamíferos somente pode ser alcançada na fase aguda, pela observação microscópica de esfregaço sanguíneo fresco, notando-se formas tripomastigotas móveis entre as hemácias (TEIXEIRA *et al.*, 2006). A detecção na fase crônica da doença se dá normalmente por demonstração indireta de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* (BRAGA *et al.*, 2000). As três reações sorológicas básicas e de alta fidelidade para o diagnóstico da doença de Chagas são: ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), a imunofluorescência indireta e a hemaglutinação indireta. E pelo menos dois testes sorológicos devem ser feitos para a confirmação da doença (GUTIÉRREZ-MARÍN *et al.*, 2004; PIRARD *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Os testes sorológicos podem apresentar resultados falso-positivos (CASTRO *et al.*, 2002). Uma técnica alternativa para o diagnóstico parasitológico é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica tem maior positividade além de maior sensibilidade em diagnosticar casos crônicos quando comparado a outros métodos (AVILA *et al.*, 1991).

A prevalência e severidade das diferentes formas clínicas da doença de Chagas podem variar de região para região (PRATA, 2001) e a causa desta heterogeneidade epidemiológica e patológica ainda não está totalmente esclarecida. No Brasil central a forma clínica predominante é a digestiva (LUQUETTI *et al.*, 1986). Contudo, a maior parte dos pacientes que apresentam comprometimentos cardíacos encontram-se presentes em estados brasileiros endêmicos da doença, como por

exemplo, em estados pertencentes a região nordeste do país (PRATA, 2001; ANDRADE *et al.*, 2015).

Sabe-se que essa variabilidade clínica depende não só de fatores genéticos do parasito, cuja estrutura populacional é bastante variável, mas também de fatores genéticos do hospedeiro (ZINGALES *et al.*, 2009; MACEDO; OLIVEIRA; PENA, 2002; MACEDO *et al.*, 2004). Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo mostraram que populações distintas do parasito são encontradas em diferentes órgãos de pacientes infectados (VAGO *et al.*, 1996), reforçando dados da existência de um tropismo tecidual diferencial, provavelmente relacionado ao desenvolvimento das formas clínicas (FRANCO *et al.*, 2003; MELO; BRENER, 1978; VERA-CRUZ *et al.*, 2003).

1.3 O *Trypanosoma cruzi*

A heterogeneidade do *Trypanosoma cruzi* (Tc) é separada em seis grupos, nomeados de TcI a TcVI, chamados de *discrete typing units* (DTU's), que são definidas como populações geneticamente mais relacionadas entre si e que possibilitam sua identificação por marcadores genéticos, moleculares ou imunológicos comuns (TIBAYRENC, 1998; ZINGALES *et al.*, 2009). O TcI abriga populações do parasito relacionadas com o ciclo de transmissão silvestre, bem como TcIII e TcIV (MILES *et al.*, 2009). As populações pertencentes a TcI exibem uma ampla distribuição geográfica, que passa pelos Estados Unidos até o norte do Chile e Argentina (YEO *et al.*, 2005; MILES *et al.*, 2009; ZINGALES *et al.*, 2012). No Brasil, encontra-se comumente na bacia Amazônica (COURA *et al.*, 2002). Em alguns países, como a Colômbia, TcI está associada com a cardiomiopatia chagásica, enquanto que em outros países mostram baixa patogenicidade (ZINGALES *et al.*, 2012; RAMÍREZ *et al.*, 2013). Em relação aos grupos TcII, TcV e TcVI, foram identificados mais ao sul da América do Sul, associados a infecções humanas. A TcII é predominante nas regiões central e sul da América do Sul. Essa DTU é encontrada em diferentes formas clínicas. As populações da TcII, apresentam uma alta diversidade entre si, estão mais envolvidas ao ciclo humano doméstico e também nos casos mais severos da doença de Chagas (DIOSQUE *et al.*, 2003; CAMPBELL; WESTENBERGER; STURM, 2004; LAGES-SILVA *et al.*, 2006; BURGOS *et al.*, 2007).

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo (ANDRADE *et al.*, 1999) mostraram que camundongos da linhagem BALB/c na fase crônica, infectados somente com a cepa monoclonal JG (TcII) apresentaram um nível muito baixo de parasitismo no cérebro, em contraste com o coração, diafragma, esôfago e sangue. E não se encontrou parasitos no reto. Camundongos da mesma linhagem, na fase crônica que foram infectados com o clone Col1.7G2 (TcI) também apresentaram um parasitismo baixo para o cérebro. Contudo, no reto e em outros tecidos analisados, Col1.7G2 foi encontrado. Infecções mistas foram também realizadas. Os camundongos na fase crônica que foram duplamente infectados com o clone Col1.7G2 e a cepa JG apresentaram no reto, um predomínio de Col1.7G2, mostrando que existe uma distribuição diferencial do clone para este órgão. JG foi encontrada quase que exclusivamente no coração e Col1.7G2 predominou no diafragma, esôfago e sangue. Análises histológicas também foram realizadas e os animais infectados somente com a cepa JG ou duplamente infectados, apresentaram nos corações processos inflamatórios mais intensos.

Mais tarde, mostramos que este tropismo podia ser influenciado pelo *background* genético do hospedeiro, onde camundongos com o mesmo haplótipo de MHC, BALB/c e DBA-2, apresentaram o mesmo perfil de seleção do *T. cruzi* nos diferentes tecidos. A cepa JG apresentou tropismo acentuado pelo coração, com presença de ninhos de amastigota em cardiomiócitos e presença de um processo inflamatório intenso e focal neste órgão, além de fibrose. Por outro lado, embora Col1.7G2 também fosse capaz de colonizar e produzir um processo inflamatório no coração este era muito menos intenso e esparso. Enquanto camundongos com haplótipo de MHC distinto, C57BL/6, apresentaram uma seleção de Col1.7G2 em quase todos os tecidos analisados, incluindo o coração, indicando uma eliminação ou diminuição da infecção por JG nestes camundongos (ANDRADE *et al.*, 2002). No entanto, os mecanismos que definem essa seleção ainda são pouco compreendidos.

Estudos posteriores, utilizando a infecção *in vitro* de culturas primárias de cardiomiócitos isolados de embriões de camundongos BALB/c, com Col1.7G2 ou JG, confirmaram os dados obtidos *in vivo* (ANDRADE *et al.*, 2010). Neste estudo foi mostrado que, embora a infecção de cardiomiócitos com a cepa JG fosse menor comparado à infecção das mesmas células pelo clone Col1.7G2, o desenvolvimento intracelular de JG nas culturas primárias de cardiomiócitos era muito mais acelerado do que aquele observado para Col1.7G2. Além disso, foi demonstrado que em

infecções mistas (JG + Col1.7G2) nestes cardiomiócitos isolados, havia uma proporção maior de JG em relação à Col1.7G2 ao longo do tempo de infecção. Dessa forma, não só a invasão, mas principalmente a multiplicação intracelular está diretamente relacionada à este processo de seleção tecidual. Estes dados também indicam que a seleção tecidual acontece em decorrência da interação direta entre parasito e célula-hospedeira, sem influência do sistema imune do hospedeiro (ANDRADE *et al.*, 2010). Adicionalmente, foi mostrado que este perfil de comportamento era dependente do tipo celular estudado, reforçando que não só o parasito, mas a célula hospedeira participa do tropismo tecidual diferencial do *T. cruzi*. Em paralelo, estudos com explantes cardíacos de camundongos BALB/c e C57BL/6 também reforçaram os dados de seleção tecidual obtidos *in vivo*. Neste estudo foi mostrado que durante infecções mistas (JG + Col1.7G2) em explantes cardíacos de camundongos C57BL/6, havia uma predominância de Col1.7G2 ao longo do tempo de desenvolvimento intracelular do parasito. Por outro lado, a mesma infecção mista em explantes de camundongos BALB/c levava a uma mistura idêntica das duas populações do parasito (FREITAS *et al.*, 2009). Além disso, neste mesmo estudo foram usados explantes de camundongos congênicos, onde foi trocado apenas o locus do MHC (BALB/B10 – *background* de BALB/c com haplótipo de MHC de C57BL/6 e C57BLKS/J – *background* de C57BL/6 com haplótipo de MHC de BALB/c). Neste caso camundongos com mesmo haplótipo de MHC apresentaram resultados similares, mostrando que o MHC pode interferir com este processo de seleção tecidual.

1.4 Infecção celular pelo *Trypanosoma cruzi*

Para invadir a célula hospedeira, o *T. cruzi* subverte o mecanismo que as células eucariotas usam para reparar pequenas injúrias em sua membrana plasmática (FERNANDES *et al.*, 2011). Quando a membrana da célula sofre uma injúria, há influxo de cálcio para o citoplasma e um conseqüente estímulo para a exocitose de lisossomos. Essa exocitose, por sua vez, é seguida de uma endocitose compensatória que carrega a membrana com a injúria para dentro da célula resselando a membrana plasmática (TAM *et al.*, 2010). Durante o processo de invasão celular, as formas tripomastigotas infectantes aderem-se à superfície desta célula e são capazes de estimulá-las através de proteínas de superfície do parasito

ou fatores secretados por eles, levando a liberação de cálcio de estoques intracelulares (TARDIEUX *et al.*, 1992; RODRÍGUEZ *et al.*, 1995; RODRIGUEZ *et al.*, 1996; RUIZ *et al.*, 1998; RODRIGUEZ *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2015). Paralelamente, durante o processo de interação e adesão do parasito à membrana da célula pequenas rupturas na membrana plasmática são geradas, provocando influxo de cálcio do meio extra para o intracelular (FERNANDES *et al.*, 2011). Em ambos os casos, como no processo de reparo, o aumento de cálcio intracelular leva ao recrutamento e exocitose de lisossomos, levando à liberação de uma enzima denominada esfingomielinase ácida (ASM) (FERNANDES *et al.*, 2011; FERNANDES; ANDREWS, 2012). ASM cliva o lipídeo esfingomielina em ceramida induzindo um processo de endocitose compensatória que culmina com a internalização do *T. cruzi* em um vacúolo contendo membrana lisossomal e porções de membrana plasmática (FERNANDES *et al.*, 2011; FERNANDES; ANDREWS, 2012). A este vacúolo mais lisossomos se fundem até que todo o vacúolo seja coberto por marcadores e conteúdo lisossomal (ANDREWS, 1994; RODRIGUEZ *et al.*, 1996). A figura 2 mostra um esquema do processo de invasão celular pelo *T. cruzi*.

Após o processo de invasão, o tripomastigota escapa do vacúolo e cai no citoplasma da célula. Seu tempo de permanência no vacúolo pode variar de célula para célula (LEY *et al.*, 1990; ANDRADE; ANDREWS, 2004). Uma vez no citoplasma o parasito transforma-se na forma amastigota, a qual se replica por divisão binária sucessivas vezes até se diferenciar novamente na forma tripomastigota (DVORAK; HYDE, 1973; ANDREWS, 1994; ANDRADE; ANDREWS, 2005). Dessa forma, o parasito passa por diferentes ambientes durante seu processo de colonização celular, os quais podem direta ou indiretamente influenciar no seu comportamento dentro da célula.

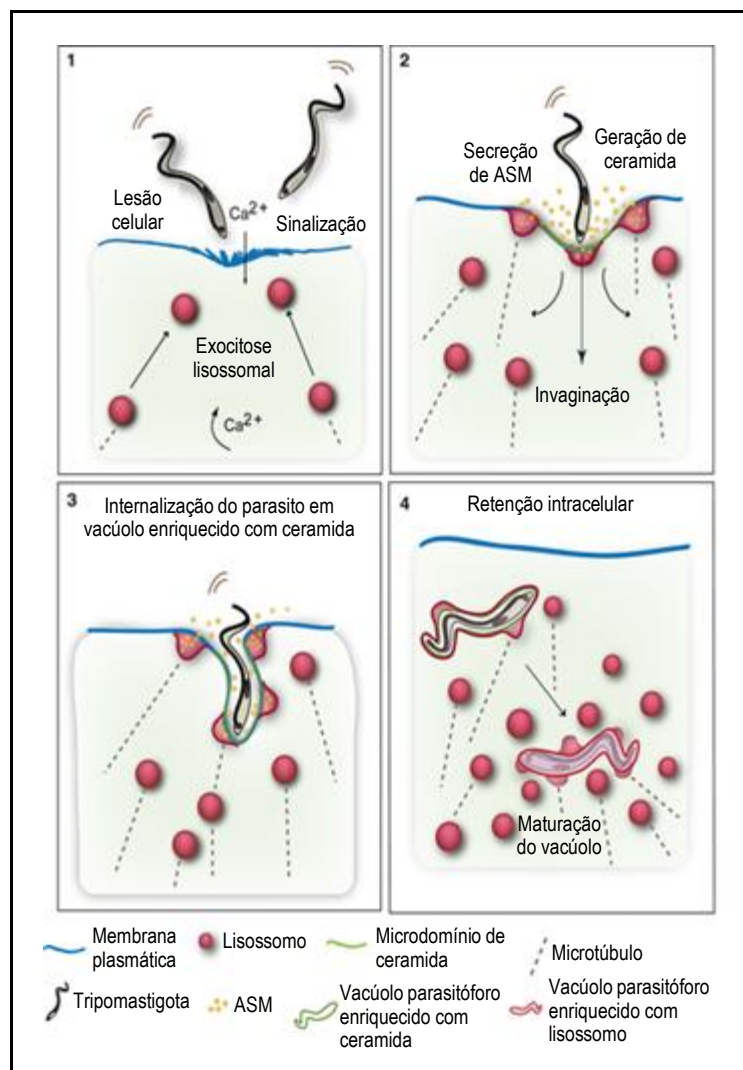


FIGURA 2 – Modelo de invasão celular pelo *T. cruzi* mediada por lesão e reparo de membrana plasmática. 1 – *Trypanosoma cruzi* promove injúrias nas células de mamíferos causando influxo de Ca^{2+} e exocitose de lisossomos. Eventos de sinalização também geram sinais transientes de Ca^{2+} citosólico. 2 – Liberação da esfingomielinase ácida (ASM) pelos lisossomos gerando ceramida no folheto externo da membrana plasmática. 3 – Microdomínios da membrana plasmática ricos em ceramida facilitam a internalização do tripomastigoto, enquanto lisossomos continuam a se fundir com o vacúolo parasitóforo nascente, liberando ASM e ceramida adicional. A ancoragem da membrana lisossomal aos microtúbulos fornece a força para puxar os parasitos para dentro das células. 4 – Tripomastigotas recentemente internalizadas residem em vacúolos parasitóforos enriquecidos em ceramida/LAMP-1, se fundem com lisossomos adicionais levando à retenção do parasito dentro da célula.

Fonte: Adaptado de Fernandes e Andrews, 2012.

1.5 Resposta celular a infecção

Células infectadas são capazes de responder à infecção ativando diversos genes, os quais poderiam interferir com o comportamento intracelular do parasito (VAENA DE AVALOS *et al.*, 2002; COSTALES; DAILY; BURLEIGH, 2009; MANQUE *et al.*, 2011).

Houston-Ludlam, Belew e El-Sayed (2016) analisaram os transcriptomas de células HFF (*Human Foreskin Fibroblasts*) 24 horas após a infecção com populações distintas do *T. cruzi* pertencentes a TcI e TcII. Estas células apresentaram genes regulados positivamente para respostas do tipo I de Interferon. O gene que mostrou também um maior aumento de 24 para 72 horas após infecção nestes fibroblastos foi um membro da superfamília de ligante do fator de necrose tumoral associado com a indução de apoptose em células tumorais. O transcriptoma de células HFF analisados nos momentos iniciais após a infecção com a cepa Y do *T. cruzi* apresentaram genes regulados positivamente para o ciclo celular da célula hospedeira e resposta imune (LI *et al.*, 2016). Moraes, Diniz e Bahia (2015), também mostraram que cardiomiócitos H9C2 após a infecção com o *T. cruzi* apresentaram um aumento na produção de Interleucina 1 β , bem como o aumento da expressão gênica duas horas após a infecção da ciclooxygenase 2, importante na produção de mediadores inflamatórios.

Cardiomiócitos, além de um importante alvo da infecção pelo *T. cruzi*, são capazes de responder a esta infecção produzindo muitas citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*), geradas devido à disfunção da mitocôndria. Tais substâncias são também importantes para o controle do *T. cruzi* e podem ser citotóxicas para componentes da célula hospedeira (MACHADO *et al.*, 2000; GUPTA *et al.*, 2009).

A produção de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α - *Tumor Necrosis Factor alpha*) e Interleucina-1 beta (IL-1 β) também foram detectadas em cardiomiócitos primários infectados com *T. cruzi* e estas citocinas junto com Interferon gama (IFN γ) se mostraram importantes para a indução de óxido nítrico e para o controle da infecção pelo parasito (MACHADO *et al.*, 2000). A produção destas mesmas citocinas e Interleucina-6 (IL-6) também foi detectada em fibroblastos em outras patologias cardíacas e se mostraram importantes na remodelação do tecido cardíaco e indução de fibrose (PORTER; TURNER, 2009). Outra citocina importante no estabelecimento da infecção celular pelo *T. cruzi* é o Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β - *Transforming Growth factor beta*). Inibição na via de sinalização de TGF- β leva a diminuição na invasão celular, no número de parasitos por célula e na taxa de transformação das formas amastigotas em formas tripomastigotas (WAGHABI *et al.*, 2007). Foi mostrado

recentemente que o receptor para TGF- β é realocado nos cardiomiócitos infectados com *T. cruzi* e co-localiza com as formas amastigotas intracelulares do parasito (CALVET *et al.*, 2016).

Além de citocinas e outros fatores secretados pelas células, em resposta à infecção, a colonização celular pelo *T. cruzi* também pode gerar a produção de espécies reativas de oxigênio. ROS provem da redução do oxigênio, gerando um grupo de íons, moléculas e radicais altamente reativos. Numerosas fontes intracelulares podem gerar ROS. Além da mitocôndria e da enzima NADPH oxidase, outras fontes celulares são ainda geradoras de ROS, como por exemplo, flavoenzima ERO1 no retículo endoplasmático, xantina oxidase, ciclooxygenases, citocromo P450, lipoxigenases, entre outras (KLAUNIG *et al.*, 2011; KRUMOVA; COSA, 2016). As espécies reativas vão atuar principalmente causando sérios danos em macromoléculas biológicas, tais como, lipídios, ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid* – DNA), ácido ribonucleico (*ribonucleic acid* – RNA) e proteínas (KLAUNIG *et al.*, 2011). A maioria das espécies reativas de oxigênio são geradas na mitocôndria como subproduto da cadeia respiratória. O termo ROS engloba radicais livres de oxigênio, tal como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil ($\cdot OH$) e oxidantes não radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As espécies reativas de oxigênio participam também de muitos processos biológicos, tais como a biossíntese hormonal, sinalização celular e destruição de patógenos intracelulares (ROMA *et al.*, 2016; ZOROV; JUHASZOVA; SOLLOTT, 2014; RADA; LETO, 2008; LANDRY; COTTER, 2014; NÜSSE, 2011). ROS estão envolvidas na sinalização, sendo capaz de ativar moléculas importantes como a proteína quinase C, que é relevante para a progressão do tumor (WU, 2006). Se relaciona ainda com a ativação de fatores de transcrição, como por exemplo, NF- κ B (PANTANO *et al.*, 2006), MAP quinase/AP-1 (*mitogen-activated*) (BENHAR; ENGELBERG; LEVITZKI, 2002) e o fator de transcrição induzível de hipoxia 1 α (HIF-1 α) (Figura 3) (RANKIN; GIACCIA, 2008).

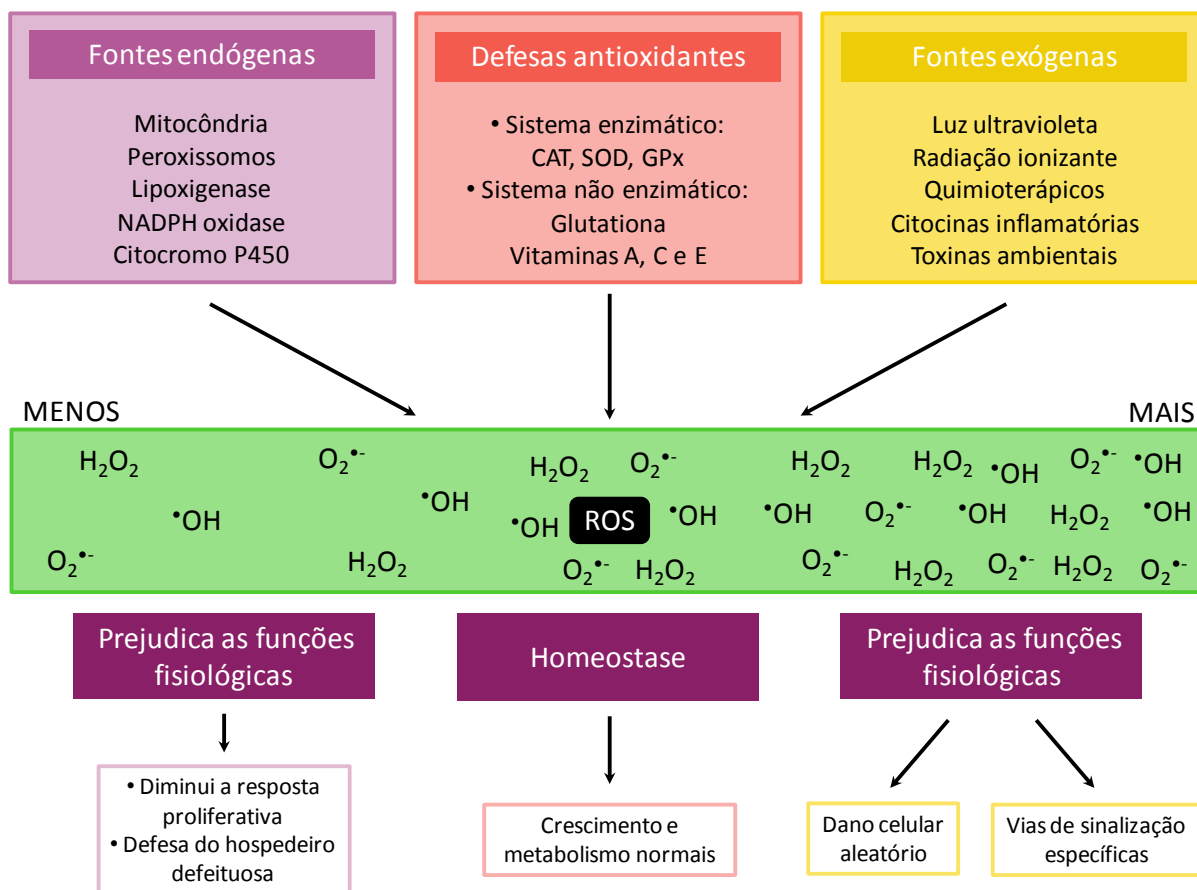


FIGURA 3 – Esquema mostrando as fontes de ROS, defesas antioxidantes e efeitos biológicos subsequentes dependentes do nível de produção de ROS.
Fonte: Adaptado de Krumova e Cosa, 2016.

A linhagem de cardiomiócitos atriais de camundongo (células HL-1) e cardiomiócitos primários de ratos adultos quando infectados pelo *Trypanosoma cruzi* apresentaram produção substancial de ROS que foi ainda aumentada pelo contato destas culturas celulares com citocinas inflamatórias. Foi mostrado que a geração de ROS nestas células foi consequência de uma disfunção mitocondrial, onde o aumento na perda de elétrons da cadeia respiratória levou à produção do ânion superóxido em cardiomiócitos (GUPTA *et al.*, 2009). Ba e colaboradores (2010) também mostraram em cardiomiócitos humanos que as espécies reativas de oxigênio produzidas pela mitocôndria contribuem para a expressão de genes de citocinas em resposta a infecção destas células com o *Trypanosoma cruzi*. A literatura, além disso, apresenta dados com relação à produção de espécies reativas de oxigênio em outros tipos celulares, como macrófagos infectados pelo *T. cruzi*. Paiva e colegas (2012), mostraram que a expressão endógena do fator eritróide nuclear tipo 2, que orchestra defesas antioxidantes, reduziu o parasitismo em

macrófagos infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, enquanto substâncias pró-oxidantes promoveram o crescimento do parasito. Goes e colaboradores (2016), também mostraram em macrófagos de camundongos selvagens C56BL/6 infectados com parasitos do *T. cruzi*, um prejuízo na proliferação intracelular quando houve inibição de ROS por agentes antioxidantes. Além disso, mostraram em macrófagos modificados expostos a H₂O₂ antes e após o contato com os parasitos, um maior índice de infecção do *T. cruzi*.

As células possuem ainda mecanismos de defesa para se proteger do efeito danoso de ROS. A enzima superóxido dismutase (SOD) converte o ânion superóxido em uma molécula de peróxido de hidrogênio, que por sua vez nos peroxissomos de células eucariontes, pela ação da enzima catalase, converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Assim a detoxificação iniciada por SOD se completa. A molécula antioxidante glutatona, também desempenha um papel importante na detoxificação catalisando a degradação do peróxido de hidrogênio (HELD, 2015).

O parasito também possui enzimas antioxidantes, capazes de “limpar” as espécies reativas de oxigênio, contribuindo para uma melhor infecção e multiplicação intracelular dos mesmos (ALVAREZ *et al.*, 2011). Parasitos que superexpressam enzimas antioxidantes, como a Peroxidase Triparedoxina Citossólica (CPX - *Cytosolic Tryparedoxin Peroxidase*) ou Peroxidase Triparedoxina Mitocondrial (MPX - *Mitochondrial Tryparedoxin Peroxidase*) são mais virulentos em infecções em camundongos (PIACENZA *et al.*, 2013).

É importante ressaltar que a defesa antioxidante presente no *Trypanosoma cruzi* é um sistema de vias interligadas e sofisticadas. Uma variedade de enzimas participam da detoxificação (IRIGOÍN *et al.*, 2008). Cinco peroxidases distintas tem sido identificadas no *T. cruzi*, diferindo em sua localização subcelular e especificidade do substrato. A glutatona peroxidase-I (TcGPXI – *T. cruzi Glutathione Peroxidase-I*), localizada no citosol e glicosomo, e a TcGPXII, localizada no retículo endoplasmático, conferem resistência contra hidro- e lipídio-peróxidos, respectivamente (WILKINSON *et al.*, 2002a; WILKINSON *et al.*, 2002b). A peroxidase triparedoxina citossólica, TcCPX e a peroxidase triparedoxina mitocondrial, TcMPX tem a capacidade de detoxificar o peroxinitrito, peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos de cadeia pequena (PIACENZA *et al.*, 2008; PIÑEYRO *et al.*, 2005; TRAJILLO *et al.*, 2004; WILKINSON *et al.*, 2000). A heme-

peroxidase dependente de ascorbato de *T. cruzi* (TcAPX - *T. cruzi* Ascorbate Peroxidase), localiza-se no retículo endoplasmático e confere resistência contra o peróxido de hidrogênio (PIACENZA *et al.*, 2008). O *Trypanosoma cruzi* possui também quatro superóxido dismutases dependentes de ferro (FeSOD – *Fe Superoxide Dismutase*), que detoxificam o superóxido gerado no citosol (FeSODB1), glicossomos (TcSODB1-2) e mitocôndria (TcSODA e C) (MATEO *et al.*, 2008).

Adicionalmente, a presença de estresse oxidativo gerado pela infecção pode também aumentar a expressão destas enzimas anti-oxidantes. Este estresse ainda pode contribuir para a manutenção de altas cargas parasitárias, bem como aumentar os níveis de Ca^{2+} intracelular nos parasitos (GADELHA *et al.*, 2013; PAIVA *et al.*, 2012; RIDGLEY; XIONG; RUBEN, 1999).

1.6 Justificativa

Com base no exposto acima, se torna de extrema importância estudar a resposta celular à infecção com diferentes cepas do *T. cruzi* e correlacionar estes dados com o tráfego intracelular do parasito e seu desenvolvimento intracelular. Isto certamente auxiliará na compreensão de seus possíveis efeitos no estabelecimento das diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Sendo assim, estudamos neste trabalho a infecção *in vitro* de cardiomiócitos e fibroblastos pelas populações clonais do *T. cruzi*, Col1.7G2 e JG, uma vez que já foi demonstrado comportamento diferencial dessas duas populações clonais de *T. cruzi* tanto *in vivo* quanto *in vitro* (ANDRADE *et al.*, 1999; ANDRADE *et al.*, 2010). Nesse estudo, avaliaremos a produção de diferentes citocinas e estresse oxidativo gerados durante a infecção com JG ou Col1.7G2, em diversos intervalos durante a infecção: logo após a invasão e durante a permanência no vacúolo parasitóforo, após seu escape do vacúolo e durante a fase de replicação. As culturas primárias de cardiomiócitos foram escolhidas para este estudo, uma vez que se aproximariam mais das condições das células *in vivo* e por serem alvos importantes durante a infecção pelo parasito.

1.7 Objetivos

1.7.1 Geral

Avaliação e comparação da resposta de cardiomiócitos frente à infecção com duas populações clonais do *T. cruzi*, Col1.7G2 e JG, durante o tráfego e ciclo de vida intracelular do parasito e sua possível correlação com o tropismo tecidual de *T. cruzi* e a patogênese da doença de Chagas.

1.7.2 Específicos

- Avaliar a invasão e multiplicação intracelular com as duas populações clonais do *T. cruzi*, Col1.7G2 e JG, em culturas primárias de cardiomiócitos de camundongos neonatos da linhagem BALB/c;
- Estudar o recrutamento de lisossomos e o tráfego intracelular destas duas populações clonais do *T. cruzi*, Col1.7G2 e JG, em cardiomiócitos primários de camundongos neonatos da linhagem BALB/c, nos tempos iniciais de infecção (logo após a invasão e 24 horas de infecção);
- Estudar o perfil de produção de diferentes citocinas em diferentes tempos de infecção (4, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas) com as duas populações clonais do *T. cruzi* em estudo, Col1.7G2 e JG, em cardiomiócitos primários de camundongos neonatos da linhagem BALB/c e correlacionar com o perfil de multiplicação intracelular;
- Avaliar a ensaios de invasão e multiplicação intracelular com as duas populações clonais do *T. cruzi*, Col1.7G2 e JG, em culturas de cardiomiócitos humanos provenientes da diferenciação de células tronco pluripotentes humanas (iPSCs), bem como em uma linhagem de fibroblastos embrionários imortalizados (WTCL3) e comparar com os dados obtidos para cardiomiócitos primários de camundongos neonatos da linhagem BALB/c;
- Estudar o perfil de indução de produção de espécies reativas de oxigênio nos diferentes tipos celulares ao longo do processo de infecção com as duas populações clonais do *T. cruzi*, Col1.7G2 e JG, e correlacionar com a multiplicação intracelular do *T. cruzi*;

- Avaliar as enzimas antioxidantes presentes nas duas populações clonais do *T. cruzi* submetidas ou não ao estresse oxidativo;
- Avaliar o efeito do estresse oxidativo na produção de moléculas sinalizadoras pelas populações clonais do *T. cruzi*, Col1.7G2 e JG.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Parasitos e tratamentos

Duas populações clonais do *Trypanosoma cruzi* foram utilizadas, Col1.7G2 e JG, pertencentes as DTU's *T. cruzi* I e II, respectivamente. A cepa JG foi isolada em 1995 pela Profa. Eliane Lages-Silva (UFTM) de um paciente crônico grave, residente da cidade de Araxá - MG, apresentando megaloesôfago avançado e tendo sido submetido a cirurgia. A cepa Colombiana foi isolada por Federici em 1969, de um paciente na fase crônica da doença apresentando manifestações cardíacas. Esta cepa foi clonada no Laboratório do Prof. Zigman Brener, sendo um dos clones obtidos utilizado neste estudo, Col1.7G2. Ambas as populações do *T. cruzi*, foram previamente analisadas e caracterizadas como monoclonais, através da análise dos oito locos de microssatélites de acordo com metodologia previamente descrita por Oliveira e colaboradores em 1998 (OLIVEIRA *et al.*, 1998)

As formas epimastigotas de Col1.7G2 e JG foram mantidas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) contendo 20 mg/mL de hemina e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB - GIBCO®) e 1% de antibiótico (Penicilina/Streptomicina - GIBCO®) em garrafas T-25 cm³, em estufa seca à 28°C (CASTELLANI; RIBEIRO; FERNANDES, 1967). A cada dois dias, eram realizadas passagens sucessivas com as formas epimastigotas para manutenção das culturas em fase exponencial de crescimento.

As formas infectantes, tripomastigotas, foram obtidas a partir de culturas de epimastigotas de Col1.7G2 e JG, mantidas em meio LIT, diferenciadas *in vitro* para tripomastigotas metacíclicos utilizando o meio de cultura TAU (*Triatomine Artificial Urine*). Para isso, os parasitos foram mantidos por duas horas no meio TAU e em seguida, transferidos e mantidos por 96 horas em meio TAU3AAG, suplementado com glicose, L-prolina, ácido L-glutâmico e ácido L-aspártico (CONTRERAS *et al.*, 1988; SOARES *et al.*, 1989). As formas tripomastigotas metacíclicas obtidas depois da diferenciação foram utilizadas para a infecção e manutenção em células VERO (células epiteliais de rim de macaco verde africano) ou LLC-MK2 (células epiteliais de rim de macaco rhesus). A manutenção do ciclo intracelular do parasito e obtenção de formas tripomastigotas de cultura foi feita em garrafas de cultura celular

de 75 cm³ contendo células VERO ou LLC-MK2, de acordo com protocolo previamente descrito por Andrews e colaboradores em 1987 (ANDREWS *et al.*, 1987). Brevemente, as células foram expostas por 48 horas a 3x10⁶ tripomastigotas de culturas de células de Col1.7G2 ou JG, lavadas e mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 2% de SFB. Os parasitos liberados das culturas infectadas foram coletados em tubos cônicos de 50 mL e purificados por centrifugação a 1400 g, por 10 minutos à temperatura ambiente (T.A.) e incubação à 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 4 horas, para permitir que as formas tripomastigotas, natantes, do parasito saíssem do *pellet* e fossem para o sobrenadante. O sobrenadante contendo as formas tripomastigotas purificadas foi recolhido e utilizado para novos ciclos de manutenção do parasito em culturas de células LLC-MK2, VERO, ou utilizado nos experimentos de infecção celular.

Formas amastigotas foram isoladas a partir de culturas de LLC-MK2 com mais de 7 dias, infectadas com as populações clonais em estudo, Col1.7G2 e JG. O sobrenadante destas culturas foi recolhido e o processamento que seguiu foi o mesmo para a obtenção da forma natante, tripomastigota de cultura. Contudo, descartamos após as 4 horas o sobrenadante e ficamos com o *pellet* rico em amastigotas de cultura. Estas amastigotas foram assim obtidas para posterior dosagem das enzimas antioxidantes.

Para alguns experimentos, os parasitos foram previamente tratados com H₂O₂ (SIGMA[®]). Para isso, soluções de H₂O₂ foram preparadas diariamente assumindo um coeficiente de extinção de 81M⁻¹ cm⁻¹ a 230 nm. O tratamento foi realizado através da incubação de 10⁷ epimastigotas em 1mL de PBS, pH 7.3 contendo ou não (controle) 30 µM de H₂O₂ a 28°C, por 30 minutos. Logo após, os parasitos foram lavados uma vez em PBS (*Phosphate Buffered Saline*), pH 7.3 e ressuspensos em meio específico de acordo com o experimento a ser realizado.

2.2 Culturas celulares e tratamentos

Os fibroblastos usados no estudo, WTCL3, foram isolados originalmente de embriões de camundongo C57BL/6 e imortalizados espontaneamente em cultura (ESKELINEN, 2006). Estas células foram mantidas em cultura por passagens sucessivas em garrafas de 25 cm³, em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico. Para os ensaios de infecção, as células foram

plaqueadas em placas de 24 poços, contendo lamínulas de vidro circulares de 13 mm de diâmetro, na proporção de 8×10^4 células por poço, 24 horas antes da execução do ensaio.

Culturas primárias de cardiomiócitos foram feitas de acordo com protocolo previamente descrito (HISSA *et al.*, 2012). Camundongos neonatos (0-2 dias) de ambos os sexos, pertencentes à linhagem BALB/c, foram limpos com álcool iodado 1%, sacrificados por decapitação e o coração foi removido e mantido em HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution* - SIGMA®) gelado. Terminada a extração dos corações, os mesmos foram lavados através da passagem sucessiva em poços de uma placa de seis poços, contendo 3 mL de HBSS gelado. Os corações foram então colocados sobre uma lâmina escavada, o átrio retirado com o auxílio de um bisturi e o restante fragmentado em pedaços menores para realização da digestão enzimática. A digestão foi realizada em tubo cônico de 50 mL contendo 7 mL de solução de HBSS, contendo tripsina / EDTA (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid* - GIBCO®) na concentração final de 0,0125%. O tubo foi mantido *overnight* a 4°C sob agitação moderada. No dia seguinte, 0,7 mL de SFB foram acrescentados ao tubo com os fragmentos cardíacos já parcialmente digeridos, juntamente com Colagenase tipo II (Worthington®) a 0,1% em meio L-15 (meio Leibovitz - SIGMA®). Logo depois foram realizados 10 ciclos de 5 minutos em *shaker* longitudinal em velocidade média, sendo que metade dos ciclos foi realizado em temperatura T.A. e os outros 5 ciclos restantes foram realizados a 37°C. Entre os ciclos, o tubo contendo os fragmentos dos corações foi vortexado somente uma vez. Ao fim dos ciclos, realizou-se a dissociação mecânica com pipeta de 10 mL. A solução contendo as células segregadas foi incubada por 5 minutos à T.A. e filtrada em peneira de 70 µm. Após a filtragem, a solução foi novamente incubada por 40 minutos a 37°C e em seguida submetida à centrifugação por 5 minutos a 300 g. O *pellet* foi ressuspensão em 10 mL de meio DMEM enriquecido com 10% de SFB e 1% de antibiótico, transferido para uma garrafa de cultura de 75 cm³ e mantido em estufa à 37°C, com 5% de CO₂, por 2 horas, para a adesão diferencial dos fibroblastos e purificação dos cardiomiócitos. Durante este período, placas de 24 poços foram preparadas com lamínulas de vidro redondas de 13 cm de diâmetro e tratadas por 2 horas com fibronectina 1 µg/mL. Os cardiomiócitos purificados foram plaqueados em placas de 24 poços na proporção de 2×10^5 células por poço em meio DMEM contendo 10% de SFB. 48 horas após o plaqueamento, as culturas receberam mais meio novo de

cultura e 72 horas depois as células foram utilizadas para os experimentos de infecção. Todos os procedimentos usados estão em conformidade com os princípios éticos da experimentação animal e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG – Protocolo 45/2009).

As culturas de cardiomiócitos humanos foram obtidas a partir da diferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) fornecidas pela companhia Pluricell Biotechnologies. As iPS fornecidas pela companhia foram obtidas a partir de um indivíduo branco, 38 anos de idade, saudável e sem problemas cardíacos relatados até o momento da obtenção das células. As células foram descongeladas e plaqueadas sob matriz extracelular para melhor adesão, após contagem pelo método de exclusão com azul de tripan, em uma confluência de 2×10^5 células por poço em uma placa de 24 poços. Terminada as 48 horas pós plaqueamento, o meio de cultura das amostras foi trocado por um novo meio. Mais quatro dias foram necessários para a total recuperação do descongelamento. Novamente o meio de cultura foi trocado e as culturas estavam prontas para serem utilizadas para os experimentos de infecção. Todos os reagentes necessários para a manutenção das culturas (matriz extracelular e meios de cultura) foram fornecidos pela companhia.

Para alguns experimentos as culturas foram tratadas com catalase, previamente à infecção. O tratamento com catalase na concentração final de 40U/mL foi realizado a partir da diluição de Catalase-polietileno glicol (*Catalase-PEG*, C4963 - SIGMA[®]) estoque (10000U/mL) no momento do tratamento, em meio DMEM contendo 2% SFB. O tratamento com catalase foi iniciado 2 horas antes da infecção e foi mantido tanto durante a infecção, quanto após o período de exposição ao parasito.

2.3 Infecção celular

As formas tripomastigotas obtidas por manutenção em cultura celular, como descrito no item 2.1, foram utilizadas para os ensaios de infecção celular. Para isso, estas formas já purificadas, foram contados em câmara de Neubauer e usados para infecção em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 50. Nos experimentos para avaliar o índice de controle respiratório a MOI foi de 10 e 20 tripomastigotas para ambas populações clonais em estudo. As infecções foram realizadas por 40 minutos e ao fim deste tempo, as culturas foram lavadas com salina tamponada com fosfato

(PBS) enriquecida com cloreto de cálcio e cloreto de magnésio (PBS^{+/+}) e fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% em PBS^{+/+} (tempo 0 h) ou re-incubadas em meio DMEM contendo 2% SFB até o momento da fixação (4, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72 ou 96 horas após a infecção). O sobrenadante de cada poço foi coletado em tubo de 1,5 mL e armazenado a -20°C para posterior análise de citocinas. Cada condição foi realizada em triplicata para as análises estatísticas.

2.4 Avaliação da taxa de invasão, escape do vacúolo e multiplicação intracelular do *T. cruzi*

Para avaliação da taxa de invasão e multiplicação intracelular, as células fixadas sobre lamínulas de vidro (0, 24, 48 ou 72 horas após a exposição aos parasitos) foram lavadas com PBS^{+/+} por três vezes e incubadas por 20 minutos em solução de 2% de albumina de soro bovina (BSA – *Bovine Serum Albumin* - SIGMA[®]) em PBS^{+/+} (PBS/BSA). Em seguida, as lamínulas foram incubadas com anticorpo primário policlonal anti-*T. cruzi* (produzido em coelho) diluído na proporção 1:500 em PBS/BSA por 50 minutos à T.A., lavadas com PBS/BSA por 3 vezes e incubadas com anticorpo secundário, marcado com Alexa-Fluor 546 (Invitrogen[®]) diluído na proporção 1:500, por 45 minutos à T.A. em solução de PBS/BSA, para marcação dos parasitos extracelulares. Terminada a incubação com o anticorpo secundário, as amostras foram lavadas com PBS/BSA e, em seguida, por três vezes com PBS^{+/+}. Logo após, as lamínulas foram incubadas com DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) diluído em PBS^{+/+} na proporção 1:1000, por 1 minuto à T.A. e lavadas com PBS^{+/+} por três vezes, para marcação dos núcleos celulares e do parasito, bem como cinetoplasto do parasito. As lamínulas foram então montadas sobre lâminas de vidro com solução de montagem PPD (*p-Phenylenediamine*) em Tris / glicerol (9:1), na concentração de 1mg/mL, e vedadas com esmalte. A determinação do número de parasitos intracelulares foi feita pelo número total de parasitos marcados com DAPI menos o número de parasitos marcados com o anticorpo anti-*T. cruzi*.

Para avaliação do tempo de escape do vacúolo parasitóforo, as células infectadas e previamente fixadas nos tempos 0, 4, 8, 12 horas após a exposição aos parasitos, foram marcadas com anticorpo primário policlonal anti-*T. cruzi*, como descrito acima. Após a incubação com anticorpo secundário marcado com Alexa-Fluor 546 (Invitrogen[®]), as células foram lavadas com PBS/BSA e em seguida

incubadas com solução PBS/BSA contendo 0,5% de Saponina (PBS/BSA/Saponina) por 20 minutos, para permeabilização das células. Após esta etapa, as células foram incubadas por 45 minutos à T.A. com anticorpo monoclonal anti-LAMP1, diluído 1:50 em PBS/BSA/Saponina. Logo depois, as células foram lavadas com PBS/BSA/Saponina por três vezes e incubadas com anticorpo secundário marcado com Alexa-Fluor 488 (Invitrogen[®]), 1:250 em PBS/BSA/Saponina, para visualização dos parasitos intracelulares associados ao vacúolo parasitóforo. As células foram mais uma vez lavadas com PBS/BSA/Saponina por três vezes e por duas vezes com PBS^{+/+}. Por fim, as amostras foram marcadas com DAPI e montadas sobre lâminas de vidro, como descrito anteriormente.

As lâminas montadas foram analisadas em microscópio de fluorescência Olympus BX51, ZEISS, Apotome.2 ZEISS ou Nikon Eclipse Ti.

2.5 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por células infectadas

Para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio foi usada a sonda CM-H₂DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester – Molecular Probes[™]), que indica o estresse oxidativo. Esta sonda se difunde dentro da célula, onde seus grupos acetatos são clivados por esterases intracelulares e o grupo reativo clorometil tiol reage com a glutathione e outros tióis intracelulares. A oxidação que se segue leva a um aduto fluorescente que permanece dentro da célula, sendo assim possível dosar às espécies reativas presentes nas culturas celulares. As culturas de cardiomiócitos primários e humanos foram plaqueadas na proporção de 2x10⁵ células por poço e infectadas de acordo com protocolo descrito no item 2.3. Finalizado o tempo de infecção, a placa foi lavada com PBS^{+/+} para a retirada dos parasitos não internalizados e reincubada em meio de cultura com 2% de SFB por mais 48 e 72 horas. Depois deste período, as células foram lavadas uma vez com PBS^{+/+} e expostas a uma solução de 10µM de CM-H₂DCFDA em PBS^{+/+} por 30 minutos em estufa úmida com 5% de CO₂ à 37°C. A placa foi então levada para leitura no *Varioskan Flash* (Thermo Scientific) para o monitoramento da taxa de oxidação da sonda CM-H₂DCFDA. Gráficos foram gerados a partir das unidades de fluorescência relativas (UFR) obtidas após a leitura para cada amostra. A partir das construções dos gráficos de linha com os valores de

UFR para cada replicata, foi possível obter o coeficiente angular da equação da reta para cada amostra. O valor obtido para cada coeficiente angular, para cada replicata foi utilizado para análise estatística e construção dos gráficos. Os dados foram analisados usando o programa SkanIt Software 2.4.5 e/ou Microsoft Office Excel 2007.

2.6 Avaliação da taxa de respiração celular

Culturas de cardiomiócitos primários foram plaqueadas na densidade de 5×10^4 células por poço em placa apropriada, *XF 24 cell culture microplate* (Seahorse Bioscience), e mantidos em estufa úmida a 37°C, com 5% de CO₂. 120 horas após o plaqueamento, as células foram expostas a cada uma das populações do *T. cruzi*, na proporção de 10 ou 20 parasitos por célula, por 2 horas em meio DMEM 2%. Terminado o tempo de infecção, os poços foram lavados por três vezes com PBS e um novo meio DMEM 2% foi acrescentado a cada poço com células e incubado por mais 48 horas. Após este período, o meio DMEM foi trocado por meio Seahorse (pH 7,4) e a placa foi incubada em estufa seca a 37°C, sem a presença do CO₂, por uma hora. Logo após as placas foram levadas para o ensaio no *XF^o 24 Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience), onde as placas foram lidas durante a adição sequencial das seguintes drogas: oligomicina (inibidor da ATP sintase) na concentração final de 5 µM, FCCP (*Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone* - agente desacoplador que permite a passagem de prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial) na concentração final de 5 µM, antimicina A (inibidor do complexo III da cadeia transportadora de elétrons) e rotenona (inibidor do complexo I) nas concentrações finais de 5 e 1 µM, respectivamente. Dessa forma, a adição sequencial das drogas permite a medição do controle respiratório celular, que relata a taxa de respiração basal, a taxa de produção de ATP, a taxa de perda de prótons e a eficiência de acoplamento, bem como a taxa respiratória máxima e a capacidade respiratória de reserva. O índice de controle respiratório (ICR) foi calculado através da fórmula (valor após adição de FCCP/valor após adição de oligomicina). O ICR é uma medida geral, única e bastante útil, já que qualquer mudança em qualquer ponto da atividade fosforilativa mitocondrial refletirá também em uma mudança no ICR (BRAND; NICHOLLS, 2011). Poços contendo meio de cultura sem células foram usados como branco.

2.7 Quantificação de enzimas antioxidantes nas diferentes formas do ciclo de vida do parasito

Para identificação e quantificação de enzimas anti-oxidantes produzidas pelas diferentes populações do *T. cruzi* utilizadas neste estudo, 1×10^7 formas tripomastigotas, amastigotas ou epimastigotas do parasito (obtidas de acordo com metodologia descrita no item 2.1) foram previamente incubadas ou não com $30 \mu\text{M}$ de H_2O_2 em $\text{PBS}^{+/+}$ por 30 minutos. As amostras foram fixadas com formaldeído 3,7% em $\text{PBS}^{+/+}$ e posteriormente submetidas à marcação com anticorpo anti diferentes enzimas anti-oxidantes do parasito. Para isso, os parasitos foram colocados em tubos de 1,5 mL, centrifugados a 12000 g a T.A., lavados por uma vez com $\text{PBS}^{+/+}$, ressuspensos em solução contendo 0,1% de Triton em $\text{PBS}^{+/+}$ e incubados por 30 minutos a T.A., para a permeabilização. Após a permeabilização, as amostras foram centrifugadas e em seguida incubadas *overnight* com cada um dos anticorpos primários policlonais de coelho ou camundongo na concentração de 1:100 (anti-APX - *Ascorbate peroxidase*, anti-MPX - *Mitochondrial Peroxiredoxin*, anti-TR - *Trypanothione reductase*, anti-TS - *Trypanothione synthetase*, anti-SODA - *Superoxide Dismutase A* e anti-SODB - *Superoxide Dismutase B*), diluídos em uma solução de $\text{PBS}^{+/+}$ (pH 7,4) contendo 0,1% de BSA e 0,5% de Tween. Após este período as amostras foram centrifugadas, lavadas em $\text{PBS}^{+/+}$ contendo 0,5% de Tween e depois incubadas por 90 minutos com anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com Alexa-Fluor 488 (anti-APX, MPX, TR e TS) ou anti-IgG de camundongo marcado com Alexa-Fluor 594 (anti-SODA e SODB) diluídos na proporção 1:100 em $\text{PBS}^{+/+}$, contendo 1% de BSA e 0,5% de Tween. Terminada a incubação com o anticorpo secundário, as amostras foram centrifugadas, lavadas com $\text{PBS}^{+/+}$ contendo 0,5% de Tween e, posteriormente, ressuspensas nesta mesma solução para a leitura no citômetro de fluxo. A leitura foi feita usando o citômetro de fluxo BD FACSCan™ ou BD FACSCalibur™. Os dados adquiridos foram analisados usando o programa BD CellQuest™ Pro 6.0 ou FlowJo™ Tree Star.

2.8 Dosagem de citocinas no sobrenadante de culturas de cardiomiócitos primários infectados por CBA (*Cytometric Bead Array*)

Os níveis de diferentes citocinas nos sobrenadantes de cultura de cardiomiócitos foram quantificados utilizando-se o sistema *Cytometric Bead Array* (CBA), Becton Dickinson, o qual utiliza esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência distintas, recobertas com anticorpos específicos para citocinas murinas, seguindo metodologia sugerida pelo fabricante (*BD Cytometric Bead Array*, 2017). Brevemente, a mistura de esferas de captura, marcadas com anticorpos monoclonais específicos para as diferentes citocinas, foram transferidas para tubos e o diluente G e as amostras de sobrenadantes a serem testadas foram adicionados. As misturas foram incubadas por 90 minutos, à T.A., ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas em PBS, ressuspensas em tampão e incubadas por 90 minutos, ao abrigo da luz, com um coquetel de anticorpos monoclonais marcados com ficoeritrina. Após a incubação, as esferas foram lavadas e ressuspensas em tampão para posterior leitura no citômetro de fluxo.

A análise do perfil de citocinas nos sobrenadantes de cultura dos cardiomiócitos foi feita segundo protocolo proposto pelo fabricante através da utilização do *BD CBA Analyses Software*, com auxílio do Microsoft Excel.

2.9 Detecção dos níveis de expressão de mRNA para *Tgf-β1*

Para a avaliação da produção de *Tgf-β1* em culturas de cardiomiócitos primários de camundongos frente a infecção com as duas populações do *T. cruzi* Col1.7G2 e JG foi realizada a quantificação através da PCR em tempo real. Culturas previamente infectadas foram utilizadas para a obtenção do RNA total. Para isso, cada poço de uma placa de seis poços, recebeu 1 mL de Trizol (Invitrogen™, USA). As amostras foram incubadas com trizol por cerca de 15 minutos para total desaderência das células. As amostras foram recolhidas em tubos 1,5 mL e mantidas a – 20°C até o momento da extração do RNA por fenol-clorofórmio. Um micrograma de RNA total foi utilizado para obter a primeira fita de cDNA, na presença de oligo-dT₁₅, dNTPs e transcriptase reversa (MMLV, Promega). PCR quantitativa (qPCR) foi realizada no sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch (Bio-Rad) utilizando iQSybr Master Mix (Bio-Rad) para detecção do

mRNA de *Tgf-β1* e *β-actina* (gene referência). Os dados foram analisados conforme o método comparativo do ciclo limiar (Ct, do inglês *cycle threshold*), de acordo com a equação $2^{-\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os resultados normalizados foram expressos como abundância relativa de mRNA.

2.10 Determinação da concentração de cálcio intracelular em parasitos

Para avaliar as concentrações de cálcio intracelular nas diferentes populações de *T. cruzi* utilizadas neste estudo, formas epimastigotas (5×10^7 /mL) foram incubados com 5 μ M de fura-2AM a 28-30°C em tampão fura (116 mM de NaCl, 5.4 mM de KCl, 0.8 mM de MgSO₄, 5.5 mM de glucose, 1 mM de CaCl₂ e 50 mM de Hepes, pH 7.0). Fura-2AM é um indicador fluorescente que se liga ao cálcio intracelular livre. Esta sonda é permeável a membrana da célula e ao cruzar a membrana, já dentro da célula, o grupo acetoximetil é removido por esterases celulares. A remoção deste grupo gera o Fura-2, um indicador de cálcio. Depois de uma hora, os parasitos foram lavados com PBS, ressuspensos a uma concentração de 10^7 parasitos/mL e incubados ou não com 30 μ M de H₂O₂ em PBS por 30 minutos a 28°C. Posteriormente, as epimastigotas foram lavadas mais uma vez com PBS, ressuspensas em 1mL de tampão fura e a fluorescência foi determinada usando espectrofotômetro Hitachi F2500, onde os parasitos permaneceram sob agitação contínua. Os valores de excitação e emissão utilizados para a leitura foram 340-380 e 510 nm, respectivamente (MORENO *et al.*, 1994; GRYNKIEWICZ; POENIE; TSIEN, 1985).

2.11 Determinação da liberação de H₂O₂ por parasitos

Para avaliar a liberação de H₂O₂ nas populações clonais de *T. cruzi* em estudo, o reagente *Amplex[®] Red* foi utilizado. O reagente *Amplex[®] Red* em combinação com a *horseradish peroxidase* (HRP), tem sido usado para detectar o H₂O₂ de amostras biológicas, incluindo células. Na presença da peroxidase, o substrato incolor, *Amplex[®] Red* reage com o H₂O₂ produzindo a resorufina, composto de alta fluorescência. Parasitos na forma epimastigota, 5×10^7 /mL foram incubados em PBS contendo 5 mM de succinato, 40 μ M de digitonina, 1 U/mL de *horseradish peroxidase* (HRP) e 25 μ M de *Amplex[®] Red* (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine -

Molecular Probes™) (PELOSO *et al.*, 2012). A fluorescência foi monitorada no comprimento de onda de excitação e emissão de 563 nm e 587 nm, respectivamente, usando um leitor de microplaca, Cytation 5. A correlação quantitativa entre a fluorescência e o H₂O₂ liberado pelas epimastigotas foi determinada como previamente descrito por Barros e colaboradores (2004).

2.12 Determinação da produção de superóxido em parasitos

Para a medição da produção de superóxido nas diferentes populações de *T. cruzi* utilizadas neste estudo, formas epimastigotas do parasito, 3x10⁸/ml foram incubadas em tampão Krebs-Henseleit (tampão KH - 15 mM de NaCO₃, 5 mM de KCl, 120 mM de NaCl, 0.7mM de Na₂HPO₄ e 1.5 mM de NaH₂PO₄) a 28°C com 5 µM de *MitoSOX* (3, 8-phenanthridine diamine, 5-(6-triphenylphosphonium hexyl)-5, 6-dihydro-6-phenyl - Molecular Probes®). O indicador de superóxido mitocondrial, *MitoSOX*, é permeável a célula e é rapidamente direcionado a mitocôndria. Na mitocôndria ocorre a oxidação exclusivamente pelo superóxido e então sua fluorescência pode ser captada. Após 10 minutos, os parasitos foram lavados e ressuspensos em tampão KH, onde a mesma concentração de células foi mantida. Em seguida, as epimastigotas foram então incubadas com H₂O₂, como descrito no item 2.1. A detecção de *MitoSOX* oxidado (*ox MitoSOX*) na suspensão de epimastigotas (5x10⁷ epimastigotas/mL) foi realizada em tampão KH na presença de 50 µM digitonina e 5 mM de succinato. A fluorescência foi detectada usando um leitor de microplaca, Cytation 5 com comprimento de onda de excitação e emissão de 510 nm e 580 nm, respectivamente (PELOSO *et al.*, 2012).

2.13 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando teste t de Student para todos os ensaios, sendo que valores de p≤0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os gráficos foram gerados no programa GraphPad Prism 5.

3 RESULTADOS

3.1 JG apresenta um desenvolvimento intracelular maior em culturas de cardiomiócitos murinos

Dados obtidos anteriormente por Andrade e colaboradores (2010), mostraram que em culturas de cardiomiócitos primários, preparadas a partir de embriões de camundongos BALB/c, era possível observar diferenças no perfil de invasão e multiplicação intracelular das populações monoclonais, JG e Col1.7G2 do *T. cruzi*. Nesse estudo foi mostrado que apesar de haver uma maior invasão do clone de Col1.7G2, havia uma maior multiplicação intracelular da cepa JG. Com o intuito de confirmar estes achados, culturas de cardiomiócitos obtidas de animais neonatos da mesma linhagem de camundongos, BALB/c, foram infectadas com as duas populações clonais de *T. cruzi*, Col1.7G2 e JG, e coletadas para análise nos tempos de 24, 48 ou 72 horas pós infecção.

Nas culturas de cardiomiócitos primários obtidas de camundongos neonatos, observamos um comportamento diferente com relação a invasão celular para essas duas populações do parasito. Culturas submetidas a infecção com a cepa JG apresentaram um número de células infectadas bem maior, cerca de três vezes maior do que aquele observado para o clone Col1.7G2 24 horas pós infecção (Figura 4A).

Com relação à multiplicação intracelular, um perfil semelhante ao previamente observado por Andrade e colaboradores (2010) foi encontrado. Em culturas de cardiomiócitos primários obtidas de camundongos neonatos, ao longo do tempo de infecção (24 a 72 horas) observamos um aumento significativamente maior no número de parasitos intracelulares por célula infectada nas culturas infectadas com JG quando comparada com culturas infectadas com Col1.7G2 (Figura 4B). 72 horas após à exposição aos parasitos, culturas infectadas com JG apresentaram um número cerca de 1,7 vezes maior no número de parasitos intracelulares em relação àquelas culturas infectadas com Col1.7G2 (Figura 4B). A figura 4C, mostra imagens representativas do número de parasitos intracelulares nas infecções dos cardiomiócitos 72 horas após a exposição a Col1.7G2 ou JG. Estes resultados indicam que apesar da diferença na taxa de invasão, JG apresenta um melhor

desenvolvimento intracelular nessas células quando comparado com Col1.7G2, como demonstrado anteriormente por Andrade e colaboradores em 2010.

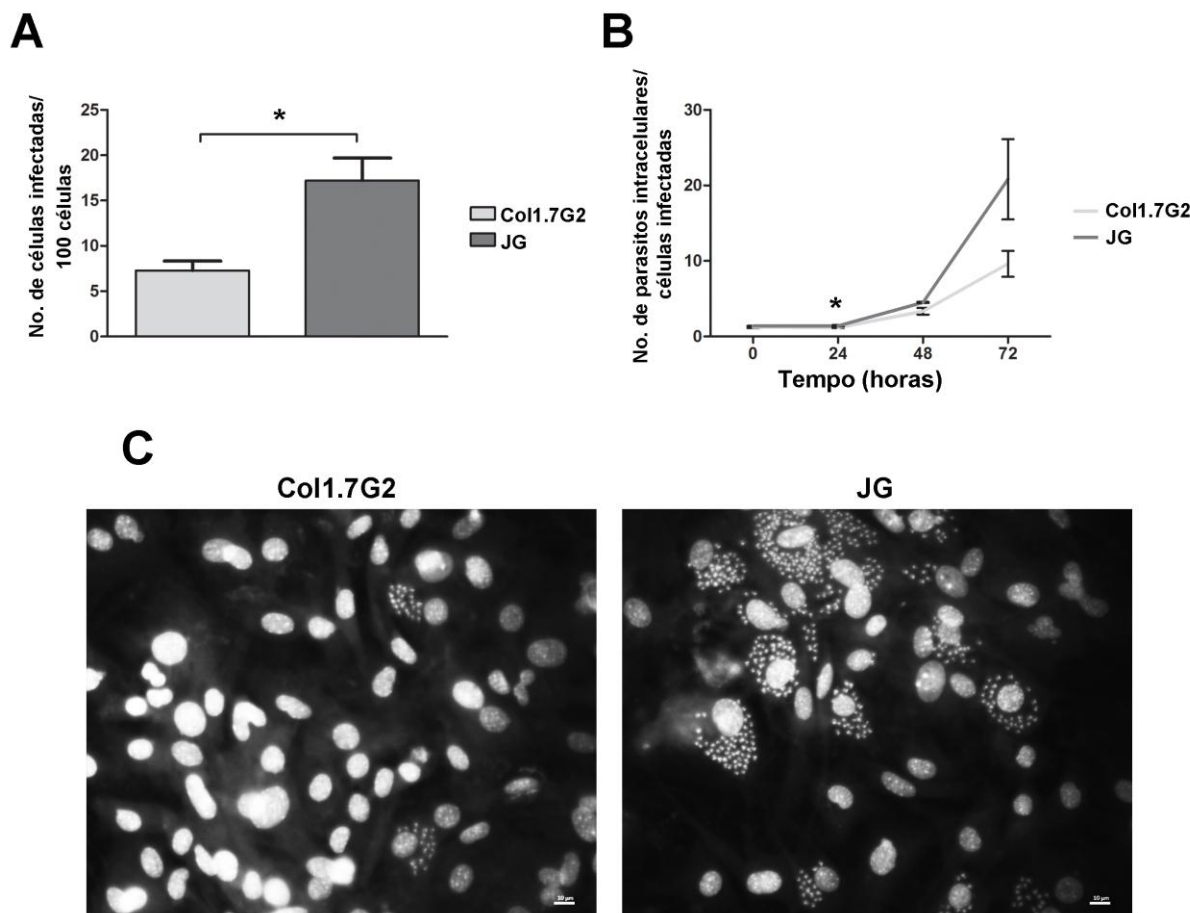


FIGURA 4 – (A-B) Quantificação das taxas de invasão e multiplicação intracelular de Col1.7G2 e JG em culturas primárias de cardiomiócitos. Culturas primárias de cardiomiócitos de camundongos neonatos foram expostas à Col1.7G2 ou JG e o número de células infectadas por 100 células 24 após a infecção (A), bem como o número de parasitos intracelulares por célula infectada (B), foram avaliados para a determinação das taxas de invasão e multiplicação intracelular, respectivamente. Os dados representam a média de triplicatas \pm o erro padrão da média (EPM). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($*p \leq 0,05$ – Teste t de Student). (C) Imagens representativas da infecção celular em culturas primárias de cardiomiócitos de camundongos neonatos BALB/c, 72 horas após a exposição à JG ou Col1.7G2. Aumento 40X. O marcador nuclear, DAPI foi utilizado para a identificação do material genético tanto do parasito, quanto da célula hospedeira. A barra de escala corresponde a 10 μ m.

3.2 O tempo de escape do vacúolo parasitóforo é semelhante para as duas populações de *T. cruzi* analisadas.

Como se sabe, quando o *T. cruzi* invade a célula hospedeira ele primeiramente reside em um vacúolo parasitóforo, formado por membrana lisossomal e, posteriormente, escapa deste vacúolo e se transforma na forma amastigota, a forma replicativa do parasito. Com o intuito de investigar se o tempo de escape do vacúolo parasitóforo poderia estar influenciando nas taxas de multiplicação intracelular observadas para JG e Col1.7G2, avaliamos também a associação destas duas populações clonais do parasito ao seu vacúolo parasitóforo, ao longo do tempo de infecção em culturas primárias de cardiomiócitos provenientes de camundongos neonatos BALB/c. Para isto, as culturas primárias de cardiomiócitos de camundongos neonatos foram infectadas com Col1.7G2 ou JG, lavadas e fixadas 0, 4, 8 ou 12 horas após a exposição aos parasitos, conforme descrito na metodologia. Populações do *T. cruzi* marcadas com DAPI e que não apresentavam a marcação com o anticorpo anti-*T. cruzi* foram considerados como parasitos intracelulares. Para avaliação da proporção de parasitos intracelulares associados ao vacúolo parasitóforo, as células foram também marcadas com anticorpo anti-LAMP-1, uma proteína presente na membrana de lisossomos, uma vez que o vacúolo parasitóforo é formado por membrana lisossomal. Dessa forma, parasitos intracelulares que se co-localizavam com este marcador, foram contados como dentro do vacúolo, os demais parasitos intracelulares foram considerados livres no citoplasma.

A figura 5 mostra o número de parasitos associados ao marcador lisossomal, LAMP-1, logo após à infecção (0h), 4, 8 e 12 horas após a exposição aos parasitos. Logo após a invasão, em torno de 50% dos parasitos internalizados estão associados à LAMP para as duas populações de *T. cruzi* analisadas. Quatro horas depois da remoção dos parasitos, o número de parasitos associados à LAMP atinge cerca de 100%. Isto se deve ao fato de que a quantidade de marcadores lisossomais associada ao vacúolo aumenta nos primeiros momentos após a invasão, facilitando sua visualização. Após este tempo (8 e 12 horas após a invasão), as taxas de associação à LAMP começam a cair, indicando que os parasitos começaram a escapar do vacúolo. As taxas de decaimento na porcentagem de associação com

LAMP foram semelhantes para as duas populações de *T. cruzi* estudadas, não havendo diferença estatisticamente significativa.

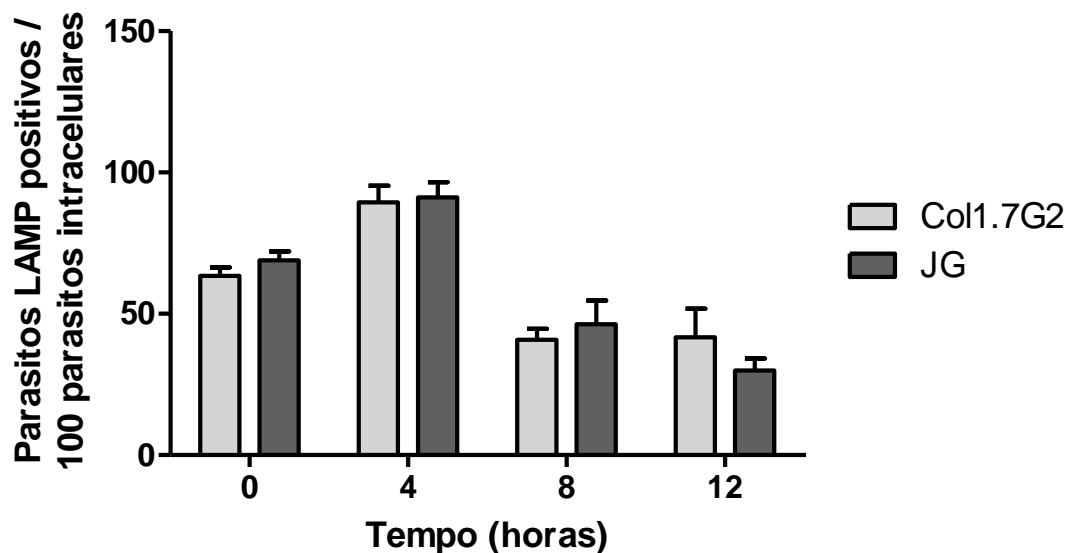


FIGURA 5 – Taxa de escape do vacúolo parasitóforo, das populações clonais de *T. cruzi*, Col1.7G2 e JG, em culturas primárias de cardiomiócitos de camundongo neonato BALB/c. O gráfico apresenta a proporção de parasitos intracelulares associadas LAMP-1, um marcador lisossomal, ao longo do tempo de infecção. Os dados representam a média de triplicatas \pm o erro padrão da média (EPM). Os dados mostrados são representativos de três experimentos individuais. (Teste t de Student).

3.3 Culturas de cardiomiócitos infectados com JG apresentam um aumento na produção de IL-6 quando comparado as culturas infectadas com Col1.7G2

Uma vez que o escape do vacúolo não foi diferente para as duas cepas, decidimos investigar se a resposta celular frente à infecção com cada uma destas populações clonais do parasito, Col1.7G2 e JG, poderiam estar influenciando o desenvolvimento intracelular diferencial nas culturas de cardiomiócitos de camundongo. Para isso, avaliamos a resposta de produção de diferentes citocinas por cardiomiócitos primários de camundongo infectados com Col1.7G2 ou JG. Foram analisados os níveis de IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- α através de FACS, utilizando o kit CBA, para avaliação do nível dessas citocinas no sobrenadante das culturas 24, 48 ou 96 horas após a infecção com JG ou Col1.7G2. Os níveis de IL-4, IL-10 e TNF- α das culturas infectadas com JG ou Col1.7G2, foram muito baixos, não sendo possível a quantificação dessas citocinas no sobrenadante das culturas. A figura 6 (A-C) mostra a intensidade média de fluorescência obtida a partir da leitura no FACS do sobrenadante das culturas infectadas com JG ou Col1.7G2. De qualquer forma, como pode ser visto, não houve diferença significativa na intensidade média de fluorescência relativa à essas citocinas entre culturas infectadas com JG ou Col1.7G2. A infecção com JG ou Col1.7G2, no entanto, foi capaz de induzir a produção de IL-6 nas culturas primárias de cardiomiócitos de camundongo, sendo possível fazer a dosagem dos níveis de produção dessa citocina nas culturas infectadas (Figura 6D). Como pode-se observar, a produção de IL-6 foi significativamente maior naquelas culturas infectadas com JG, em relação àquelas infectadas com Col1.7G2 (Figura 6D).

Paralelamente, através da técnica de PCR em tempo real, avaliamos os níveis de mRNA para *Tgf- β 1* nas culturas infectadas com JG ou Col1.7G2. Para isso, culturas infectadas com JG ou Col1.7G2 foram coletadas nos tempos de 4, 8, 12 e 24 horas após a infecção, o RNA total foi extraído e processado para a preparação do cDNA e PCR em tempo real, como descrito na metodologia. Foi observada uma variação nos níveis de mRNA para *Tgf- β 1* ao longo do tempo, tanto para as culturas infectadas com Col1.7G2 quanto para as culturas infectadas com JG (dados não mostrados). Dessa forma, não foi possível correlacionar os níveis de mRNA para *Tgf- β 1* com o crescimento diferencial do parasito em cultura de cardiomiócitos.

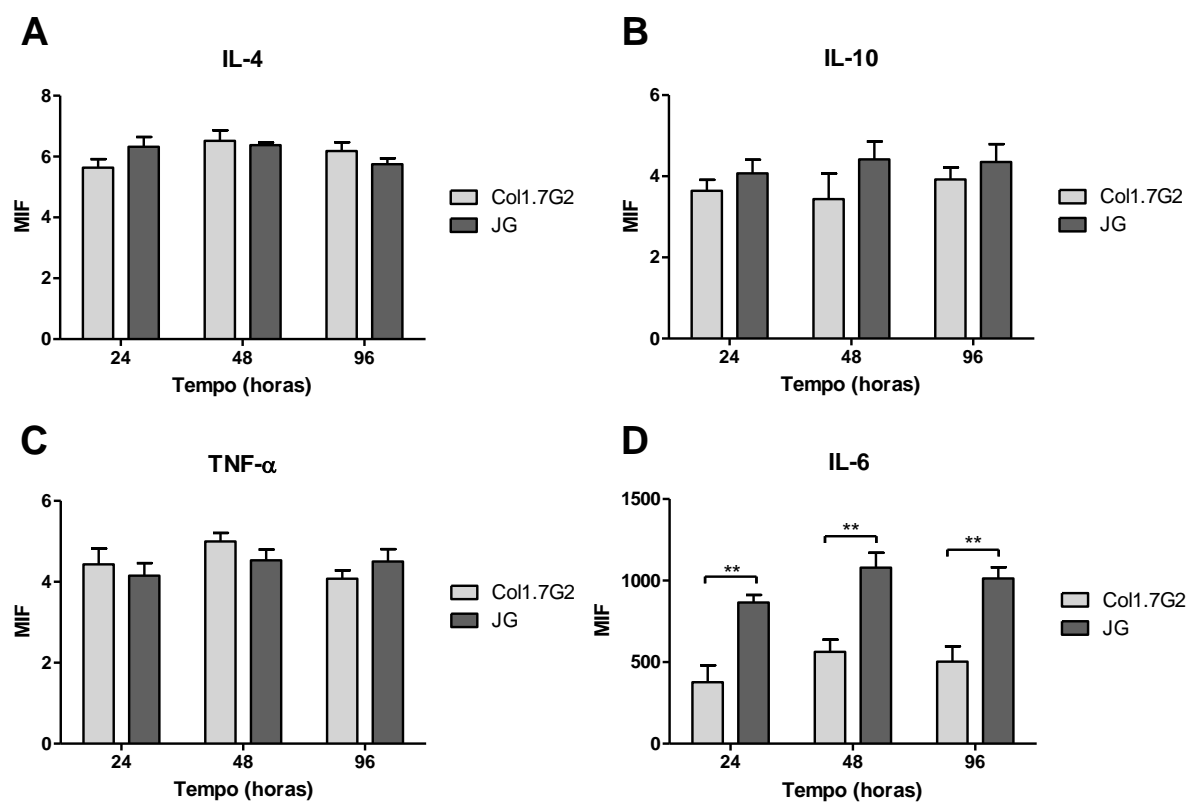


FIGURA 6 – Avaliação da produção das citocinas IL-4 (A), IL-10 (B), TNF- α (C) e IL-6 (D) no sobrenadante de culturas primários de cardiomiócitos de camundongos neonatos BALB/c infectadas, ao longo de 96 horas de infecção, com Col1.7G2 ou JG. Os dados representam a média de triplicatas \pm o erro padrão da média (EPM). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (** $p \leq 0,01$ – Teste t de Student).

3.4 Culturas de cardiomiócitos primários de camundongos infectadas com JG produzem mais ROS

Como mencionado anteriormente, os resultados anteriores mostraram que as culturas primárias de cardiomiócitos de camundongo mostraram-se mais permissivas à multiplicação intracelular da cepa JG em comparação a Col1.7G2. No intuito de identificar outros possíveis fatores responsáveis por este crescimento diferencial, avaliamos os níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) frente à infecção dessas células com as populações clonais do *T. cruzi* em estudo. Sabe-se que a infecção pelo parasito pode induzir a produção de ROS, a qual pode controlar negativa ou positivamente o desenvolvimento intracelular do parasito (ALVAREZ *et al.*, 2011; PAIVA *et al.*, 2012). A análise da produção de ROS foi feita utilizando-se a sonda CM-H₂DCFDA adicionada à culturas controle ou infectadas, de acordo com a descrição na metodologia. Quando oxidada, CM-H₂DCFDA fluoresce, sendo a quantidade de fluorescência produzida uma medida indireta da produção celular de espécies reativas de oxigênio (ROS). A medida dos níveis de fluorescência foi realizada no tempo 48 ou 72 horas após a infecção, tempo correspondente à fase de multiplicação intracelular do parasito.

No tempo 48 horas, não foi observada diferença significativa na quantidade de sonda oxidada para aquelas culturas infectadas com Col1.7G2, em relação ao controle (culturas não infectadas) (Figura 7). Por outro lado, neste mesmo tempo observou-se uma maior oxidação da sonda, cerca de 1,6 vezes, para aquelas culturas infectadas com JG (0,019615), em relação ao controle ou às culturas infectadas com Col1.7G2, indicando uma maior produção de ROS após a infecção com JG (Figura 7). No tempo 72 horas, tanto culturas infectadas com JG quanto com Col1.7G2 apresentaram níveis de oxidação da sonda significativamente maiores quando comparado às culturas controle, indicando maior produção de ROS para ambas culturas infectadas (Figura 7). Ainda, embora os níveis de oxidação da sonda em culturas infectadas com JG tenham sido maior do que em culturas controle em ambos os tempos, os maiores valores de CM-H₂DCFDA oxidada foram observados 48 horas após a infecção com JG, exatamente 24 horas antes da maior diferença nos números de parasitos intracelulares observados entre culturas infectadas com JG ou Col1.7G2 (Figura 7).

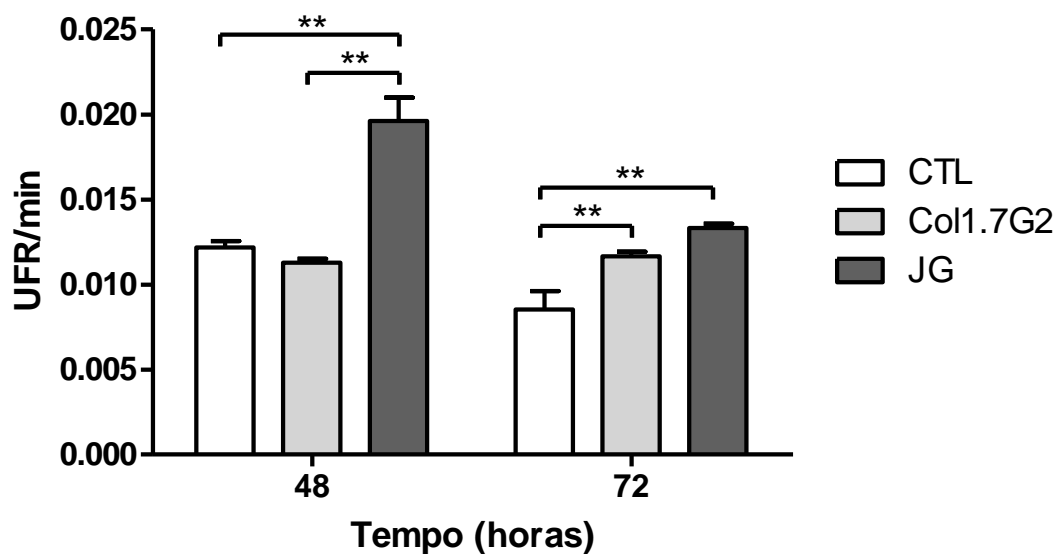


FIGURA 7 – Fluorescência relativa de CM-H2DCFDA oxidada presente em culturas primárias de cardiomiócitos de camundongos neonatos BALB/c, 48 e 72 horas após a infecção com Col1.7G2 ou JG. Culturas de cardiomiócitos primários não infectadas mantidas pelos mesmos tempos foram usadas como controle (CTL). Os dados representam a média de duplicatas \pm o erro padrão da média (EPM). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (** $p < 0,01$ – Teste t de Student).

3.5 Maior disfunção mitocondrial em cardiomiócitos primários expostos a JG

De acordo com os dados mostrados anteriormente, culturas infectadas com JG apresentam maior oxidação de CM-H₂DCFDA, indicando maior produção de ROS. Foi demonstrado na literatura que a infecção de culturas de cardiomiócitos primários com *T. cruzi* leva à produção de ROS, cuja principal fonte é mitocondrial (GUPTA *et al.*, 2009). Dessa forma, avaliamos o índice de controle respiratório (ICR) em culturas de cardiomiócitos primários de camundongo infectadas ou não com formas tripomastigotas de Col1.7G2 ou JG. O ICR permite verificar a capacidade respiratória da mitocôndria e, por consequência sua capacidade de oxidação do substrato com baixa perda de prótons. Dessa forma, quanto maior o ICR, menor a probabilidade de disfunção da mitocôndria e produção de ROS, enquanto o contrário significa maior disfunção mitocondrial e provavelmente maior produção de ROS.

Para avaliação do ICR, foram realizadas infecções utilizando-se uma MOI de 10 ou 20 tripomastigotas e as culturas foram analisadas 48 horas após a infecção. Culturas infectadas com JG ou Col1.7G2 na proporção de 10:1 não apresentaram diferenças significativas de ICR em relação ao grupo controle, não infectado (Figura 8). Para culturas de cardiomiócitos infectadas com Col1.7G2 na proporção de 20:1 foi observado um aumento significativo no ICR tanto em relação à culturas controle, quanto à culturas infectadas com JG na mesma proporção ou culturas infectadas com Col1.7G2 na proporção de 10:1 (Figura 8). Estes resultados demonstram que a infecção com Col1.7G2 não provoca disfunção mitocondrial, indicando baixa produção de ROS por essas células e corroborando os dados obtidos através da oxidação da sonda CM-H₂DCFDA. Por outro lado, culturas infectadas com JG na proporção de 20:1 apresentaram um ICR significativamente menor quando comparado à culturas controles ou àquelas infectadas com Col1.7G2 na mesma proporção. (Figura 8). Estes dados novamente corroboram os dados utilizando a sonda CM-H₂DCFDA, indicando maior disfunção mitocondrial e consequente maior produção de ROS para culturas de cardiomiócitos infectadas com JG.

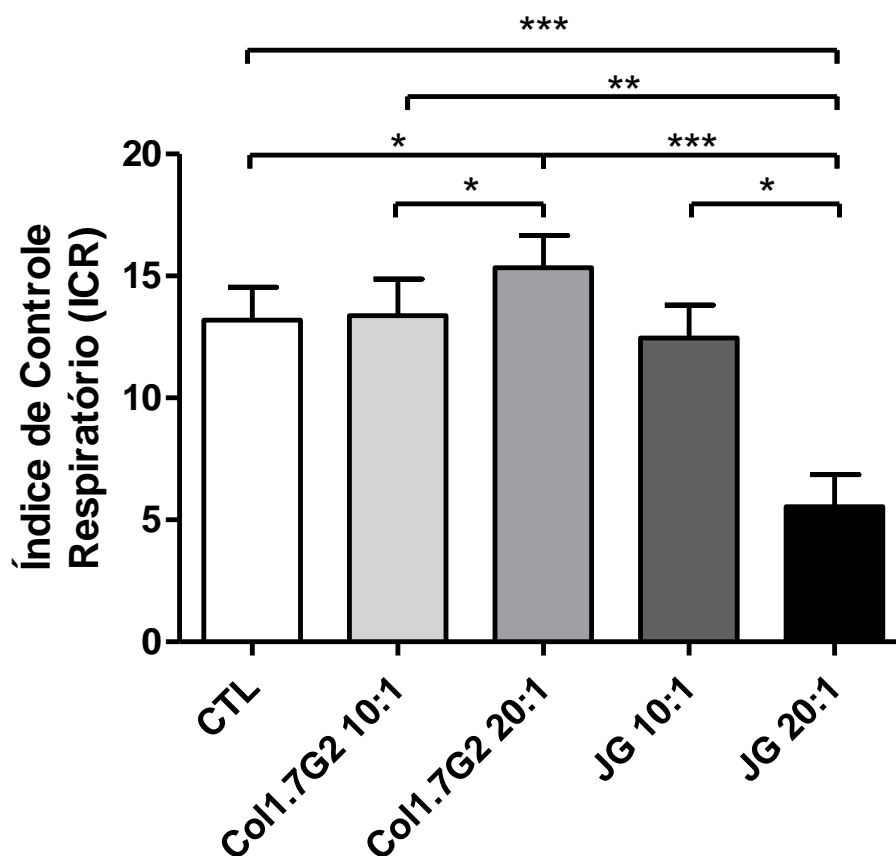


FIGURA 8 – Índice de controle respiratório (ICR) em culturas primárias de cardiomiócitos de neonatos BALB/c infectadas com diferentes concentrações das duas populações clonais de *T. cruzi*, Col1.7G2 e JG, 48 horas após a infecção. CTL (controle) células não infectadas; As razões 10:1 e 20:1 se referem à MOI utilizada. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ teste t de Student).

3.6 O clone Col1.7G2 apresenta uma maior quantidade de enzimas antioxidantes

Para avaliar a capacidade de lidar com a produção de ROS pelas células hospedeiras, foram quantificados os níveis basais de diferentes enzimas antioxidantes do parasito (APX – *Ascorbate peroxidase*, MPX – *Mitochondrial Peroxiredoxin*, TR – *Trypanothione Reductase*, TS – *Trypanothione Synthase*, SOD A – *Superoxide Dismutase A* e SOD B – *Superoxide Dismutase B*), através da marcação com anticorpo policlonal, direcionado a cada uma dessas enzimas, nas diferentes formas do ciclo de vida do parasito: epimastigota, tripomastigota e amastigota.

Os histogramas da figura 9 representam a intensidade de fluorescência obtida para as diferentes formas do parasito, para as diferentes enzimas. Quanto maior a expressão das enzimas, maior o número de células apresentando níveis mais altos de fluorescência. Como pode ser observado na figura 9, as enzimas anti-oxidantes APX, MPX e TS foram encontradas em maior quantidade nas formas epimastigotas de Col1.7G2, quando comparado com as mesmas formas de JG. Os mesmos resultados foram observados para forma amastigota, embora neste caso o aumento na expressão de APX, MPX e TS foi menor do que aquele observado para as formas epimastigotas (Figura 9). Para essas formas, observou-se também um discreto aumento na expressão de TR para Col1.7G2 em relação à JG (Figura 9). Para as formas tripomastigotas também foi observado um aumento na expressão de TR em Col1.7G2, quando comparado à JG, sendo mais expressivo nesta forma do que aquele observado para as formas amastigotas (Figura 9). Estes achados mostram que, em geral, Col1.7G2 apresentou maior expressão de enzimas anti-oxidantes em relação à JG em todas as formas do ciclo de vida do parasito.

Para saber se o perfil de produção de enzimas antioxidantes pelo *Trypanosoma cruzi* seria o mesmo após a exposição dos parasitos ao estresse oxidativo, formas epimastigotas das duas populações de *T. cruzi*, Col1.7G2 e JG foram incubadas com peróxido de hidrogênio, previamente à avaliação da expressão das enzimas. Para isso, os parasitos foram submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de H₂O₂ (5, 10, 30, 50, 100 µM) por seis dias. No sexto dia, foi realizada a contagem dos parasitos e como observado na figura 10, ainda houve crescimento de ambas as populações clonais na concentração de 30 µM de H₂O₂.

Dessa forma, definimos a concentração de 30 μM de H_2O_2 para uso nos experimentos realizados para avaliação de expressão de enzimas anti-oxidantes do parasito, sob condição de estresse.

Mesmo após a exposição prévia ao estresse oxidativo (30 μM de H_2O_2), uma maior produção das enzimas antioxidantes foi encontrada para formas epimastigotas do clone Col1.7G2. Nessa condição foi observada maior expressão de MPX e TR, bem como um ligeiro aumento na expressão de SOD B em Col1.7G2, quando comparado à expressão das mesmas enzimas em JG (Figura 11). Importante notar que para ambos os parasitos houve um aumento na expressão de SOD A e B após a exposição à H_2O_2 .

O mesmo ensaio, com tratamento prévio com 30 μM de H_2O_2 , foi realizado para as formas amastigotas das duas populações do *T. cruzi*, Col1.7G2 e JG. A marcação para estas formas foi baixa para todas as enzimas testadas. No entanto, novamente parece haver uma maior expressão de enzimas anti-oxidantes em Col1.7G2. Foi observada um maior sinal de fluorescência para as enzimas antioxidantes MPX, TR e TS no clone Col1.7G2 quando comparado à JG (Figura 12).

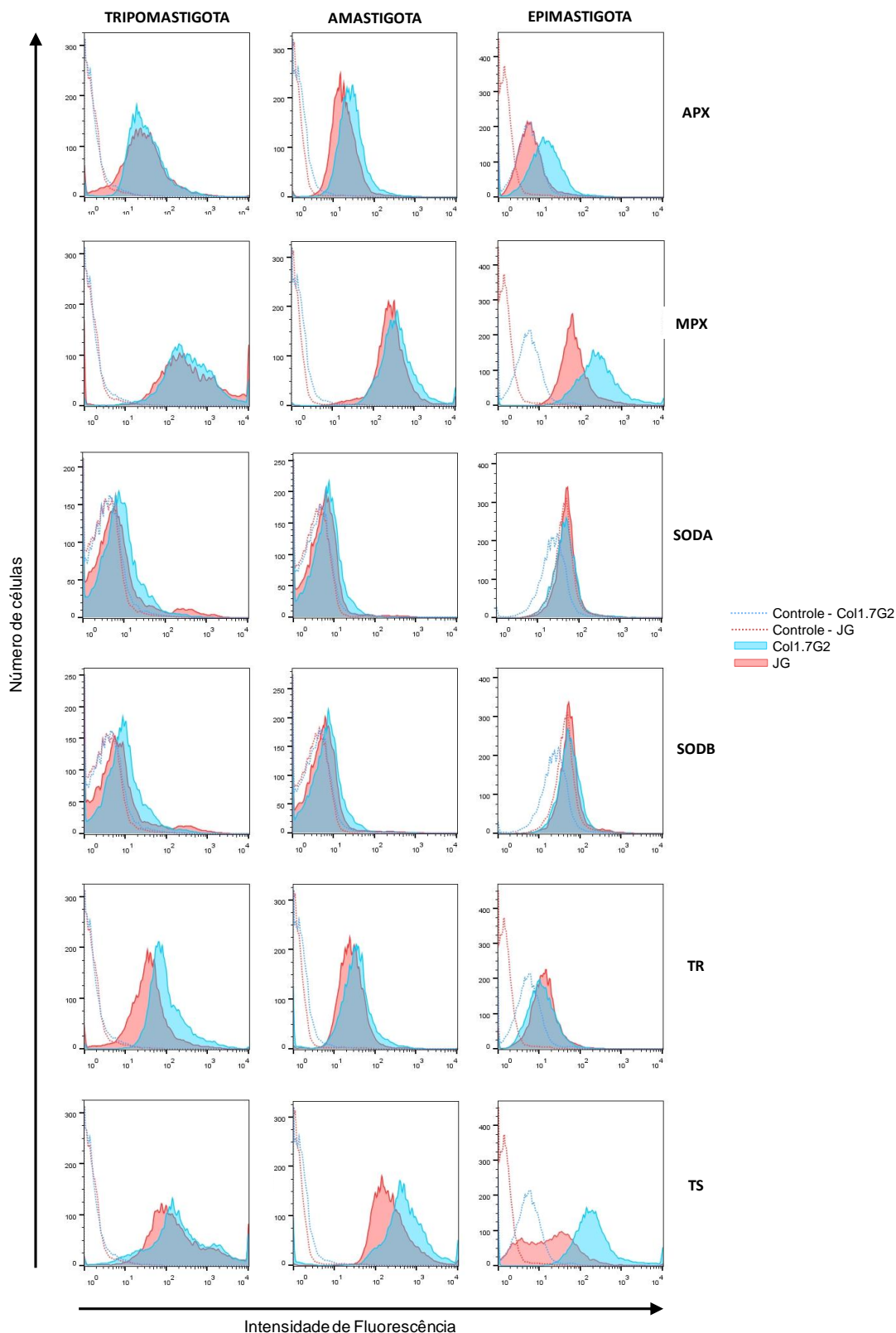


FIGURA 9 – Intensidade média de fluorescência obtida a partir da marcação de formas tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas das duas populações clonais do *T. cruzi*, Col1.7G2 (azul) e JG (vermelho). Tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas, foram marcadas com anticorpos monoclonais contra diferentes enzimas anti-oxidantes do *T. cruzi*: Ascorbato peroxidase – APX, Peroxiredoxina mitocondrial - MPX, Superóxido Dismutase A – SOD A, Superóxido Dismutase B – SOD B, Tripanotiona Redutase – TR e Tripanotiona Sintase - TS. As linhas pontilhadas mostram parasitos não marcados.

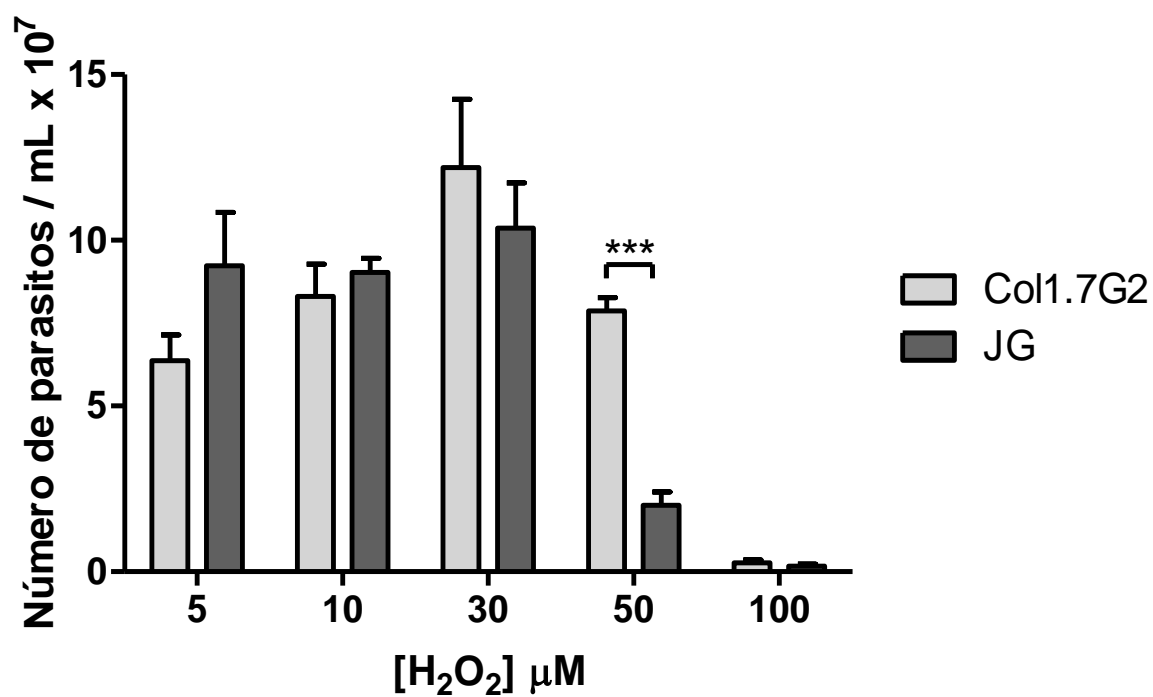


FIGURA 10 – Crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi* na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. Os parasitos foram mantidos em meio LIT por seis dias em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio e depois contados para avaliação do número de parasitos por mL de meio. Os dados representam a média de triplicatas \pm o erro padrão da média (EPM). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (***) $p \leq 0,001$ – Teste t de Student).

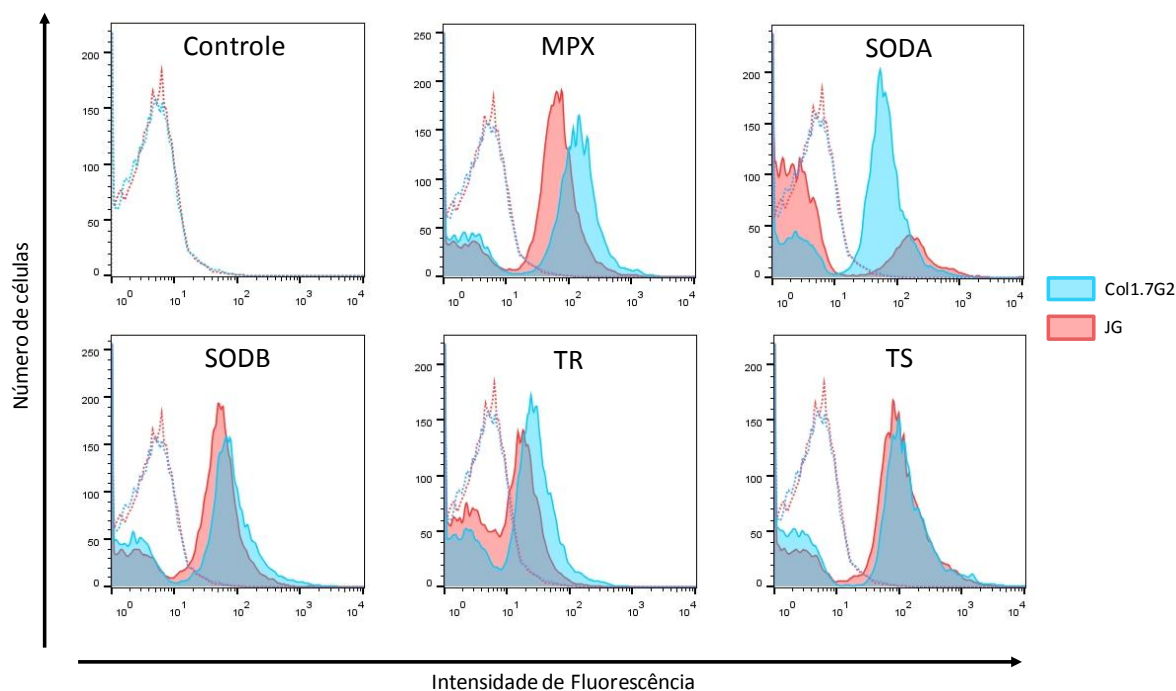


FIGURA 11 – Intensidade média de fluorescência obtida a partir da marcação de formas epimastigotas das duas populações clonais de *T. cruzi*, Col1.7G2 (azul) e JG (vermelho). As formas epimastigotas foram expostas à 30 μM de H_2O_2 e posteriormente marcadas com anticorpos monoclonais contra diferentes enzimas anti-oxidantes do *T. cruzi*. As linhas pontilhadas mostram parasitos não marcados.

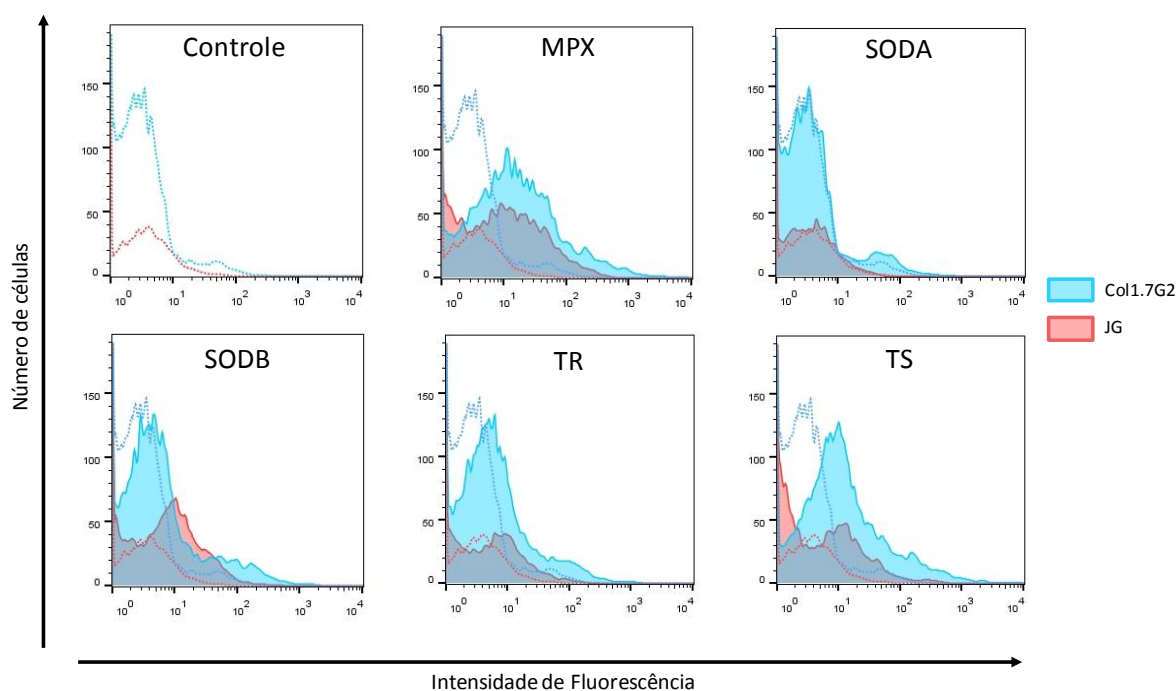


FIGURA 12 – Intensidade média de fluorescência obtida a partir da marcação de formas amastigotas das duas populações de *T. cruzi*, Col1.7G2 (azul) e JG (vermelho). As formas amastigotas foram expostas à 30 μM de H_2O_2 e posteriormente marcadas com anticorpos monoclonais contra diferentes enzimas anti-oxidantes do *T. cruzi*. As linhas pontilhadas mostram parasitos não marcados.

3.7 O tratamento com catalase compromete o desenvolvimento intracelular de JG em cardiomiócitos de camundongos

Os resultados anteriores mostraram que JG desenvolve-se melhor em culturas de cardiomiócitos primários de camundongos neonatos BALB/c, bem como leva a uma maior produção de ROS quando comparado as mesmas culturas infectadas com o clone Col1.7G2 (Figura 4B e 7). Dessa forma, investigamos se a inibição do estresse oxidativo através da incubação das culturas de cardiomiócitos com catalase, enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio, interferiria no crescimento intracelular das duas populações de *T. cruzi* em estudo, JG e Col1.7G2.

As culturas de cardiomiócitos de camundongos foram então incubadas com a enzima catalase, como descrito na metodologia. Observamos que após o tratamento, a taxa de invasão no início da infecção não se mostrou diferente para ambas populações clonais, Col1.7G2 e JG (Figura 13A), diferente do que foi visto em culturas sem tratamento, onde a cepa JG invadiu um maior número de células. Com relação a taxa de multiplicação intracelular do parasito, não foi observada alteração na taxa de crescimento intracelular de Col1.7G2 antes e após o tratamento com catalase (Figura 4B e 13B). Por outro lado, o tratamento com catalase levou a uma significativa alteração no desenvolvimento intracelular de JG. Culturas tratadas com catalase e infectadas com JG apresentaram um número significativamente menor de parasitos quando comparado a culturas tratadas com catalase e infectadas com Col1.7G2 (Figura 13B), bem menor que aquele observado para culturas não tratadas infectadas com JG (Figura 4B). Nas culturas tratadas com catalase, o número de parasitos intracelulares de Col1.7G2 em relação a JG foi cerca de duas vezes maior no tempo de 72 horas após a infecção (Figura 13B).

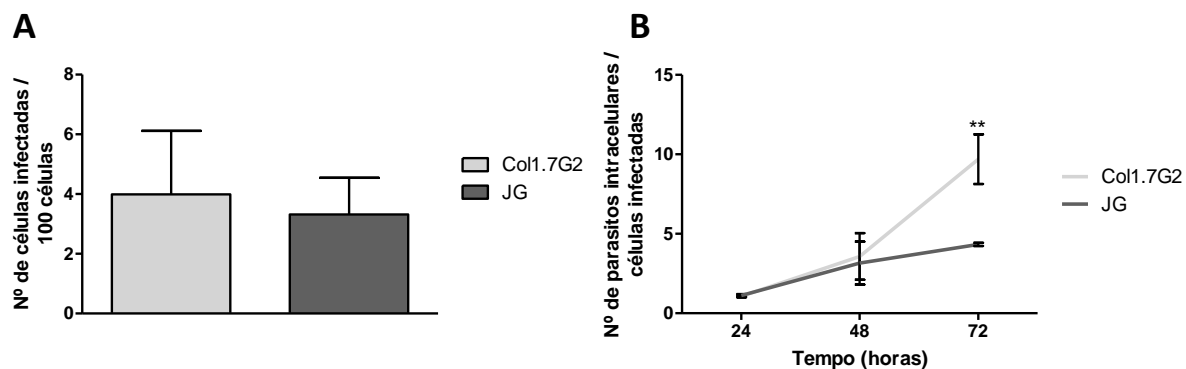


FIGURA 13 – (A-B) Quantificação das taxas de invasão e multiplicação intracelular de Col1.7G2 e JG em culturas primárias de cardiomiócitos de camundongos neonatos BALB/c, tratadas com catalase. Culturas de cardiomiócitos primários foram tratadas com catalase e então expostas à Col1.7G2 ou JG e o número de células infectadas por 100 células (A), bem como o número de parasitos intracelulares por célula infectada (B), foram avaliados para a determinação da taxa de invasão e multiplicação intracelular, respectivamente. Os dados representam a média de triplicatas \pm o erro padrão da média (EPM). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (** $p \leq 0,01$ – Teste t de Student).

3.8 Cardiomiócitos humanos apresentam um perfil de desenvolvimento intracelular de Col1.7G2 e JG semelhante ao observado para cardiomiócitos de camundongos

Os dados obtidos para culturas primárias de cardiomiócitos de camundongos BALB/c, sugerem que o estresse oxidativo gerado durante a infecção beneficia o crescimento de JG nessas culturas. Com o intuito de verificar se estes dados poderiam ser reproduzidos em cardiomiócitos humanos realizamos culturas de cardiomiócitos humanos obtidas a partir de células tronco humanas pluripotentes induzidas. As culturas de cardiomiócitos humanos foram então submetidas à mesma metodologia de infecção com Col1.7G2 e JG e as taxas de invasão e multiplicação intracelular foram avaliadas.

Ao contrário do observado para as culturas primárias de camundongos neonatos, a taxa de invasão observada nos cardiomiócitos humanos se assemelha ao resultado anteriormente obtido por Andrade e colaboradores (2010), onde Col1.7G2 apresentou um maior número de células infectadas 24 horas após à exposição aos parasitos, cerca de 1,5 vezes maior em relação à JG (Figura 14A). Com relação ao crescimento dos parasitos, também observamos um maior crescimento da cepa JG em relação ao clone Col1.7G2 ao longo do tempo de infecção. Após 72 horas de infecção, as culturas de cardiomiócitos humanos infectadas com JG apresentaram um maior número de parasitos intracelulares quando comparado com Col1.7G2. Culturas infectadas com JG apresentaram cerca de duas vezes mais parasitos por célula infectada quando comparado com culturas infectadas com Col1.7G2 (Figura 14B). Esse perfil foi também parecido com aquele obtido para culturas de cardiomiócitos primários provenientes de camundongos neonatos infectados com essas mesmas populações do parasito (Figura 4B).

A figura 14C, mostra imagens representativas do número de parasitos intracelulares nas infecções dos cardiomiócitos com cada uma das populações do parasito, 72 horas após a exposição aos mesmos. Estes resultados indicam que apesar da diferença na taxa de invasão, JG apresenta um melhor desenvolvimento intracelular nessas células quando comparado com Col1.7G2.

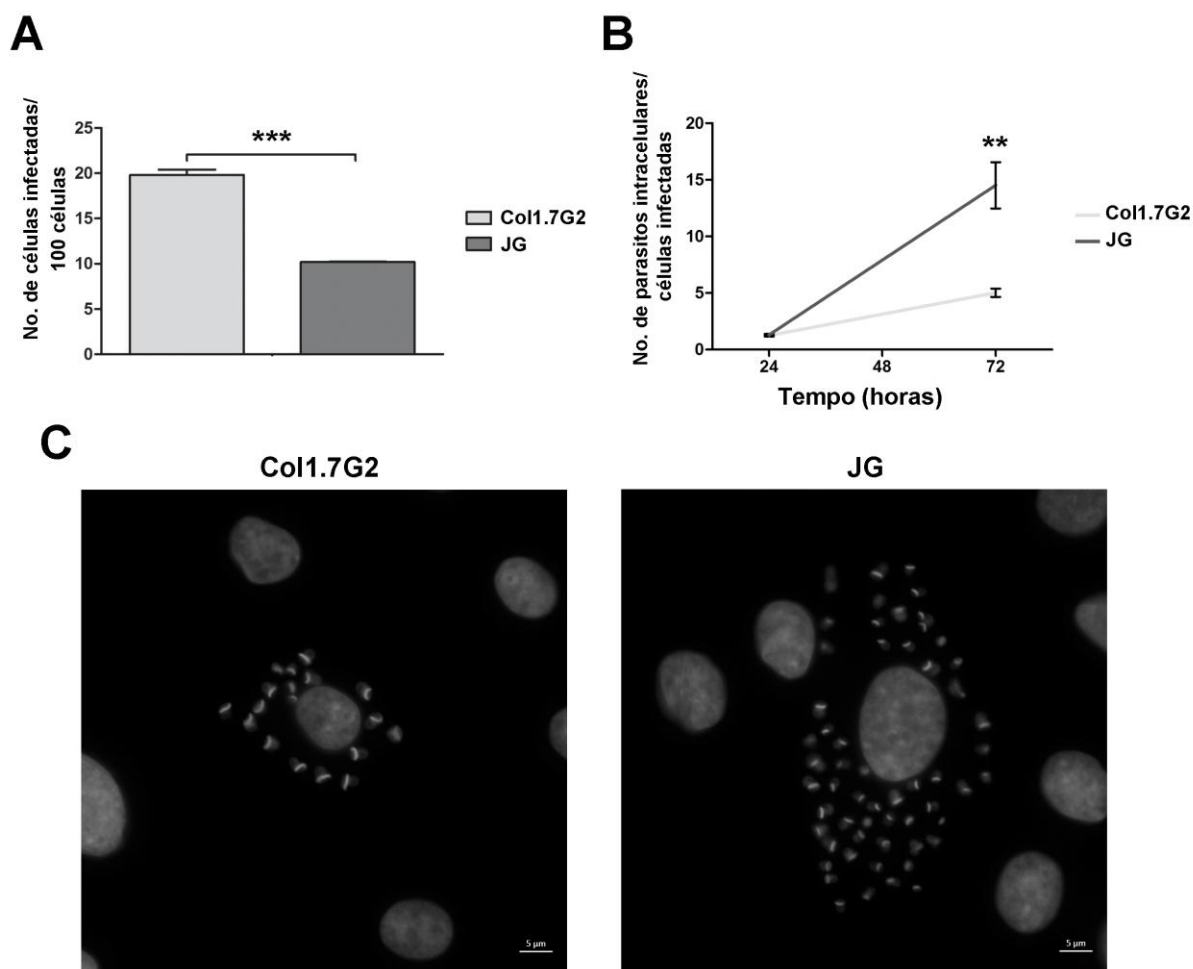


FIGURA 14 – (A-B) Quantificação das taxas de invasão e multiplicação intracelular de Col1.7G2 e JG em culturas de cardiomiócitos humanos. Culturas de cardiomiócitos humanos provenientes de iPSCs foram expostas à Col1.7G2 ou JG e o número de células infectadas por 100 células (A), bem como o número de parasitos intracelulares por célula infectada (B), foram avaliados para a determinação da taxa de invasão e multiplicação intracelular, respectivamente. Os dados representam a média de triplicatas \pm o erro padrão da média (EPM). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($***p \leq 0,001$ e $** p \leq 0,01$ – Teste t de Student). (C) Imagens representativas da infecção celular em culturas de cardiomiócitos humanos provenientes de iPSCs, 72 horas após a exposição à JG ou Col1.7G2. Aumento 60X. O marcador nuclear, DAPI foi utilizado para a identificação do material genético tanto do parasito, quanto da célula hospedeira. A barra de escala corresponde a 5 μ m.

3.9 Culturas de cardiomiócitos humanos infectadas com JG produzem mais ROS

Assim como observado para as culturas de cardiomiócitos primários de camundongo infectadas com JG ou Col1.7G2, os resultados com as culturas de cardiomiócitos humanos infectados com as mesmas populações do parasito também se mostraram mais permissivas à multiplicação intracelular da cepa JG em comparação a Col1.7G2. Sendo assim, decidimos avaliar se também nessas células, JG era capaz de induzir níveis mais altos de ROS em comparação às culturas infectadas com Col1.7G2. A análise da produção de ROS foi feita novamente utilizando-se a sonda CM-H₂DCFDA adicionada à culturas controle ou infectadas, de acordo com o descrito na metodologia. A medida dos níveis de fluorescência foi realizada no tempo de 48 horas após a infecção.

Mais uma vez, não foi observada diferença significativa na quantidade de sonda oxidada para aquelas culturas infectadas com Col1.7G2, em relação ao grupo controle (culturas não infectadas) (Figura 15). Por outro lado, neste mesmo tempo observou-se uma oxidação significativamente maior da sonda, cerca de 1,52 vezes, para aquelas culturas infectadas com JG (0,0063), em relação ao controle ou cerca de 1,29 vezes maior em relação às culturas infectadas com Col1.7G2 (0,0049), indicando também para essas células uma maior produção de ROS após a infecção com JG (Figura 15).

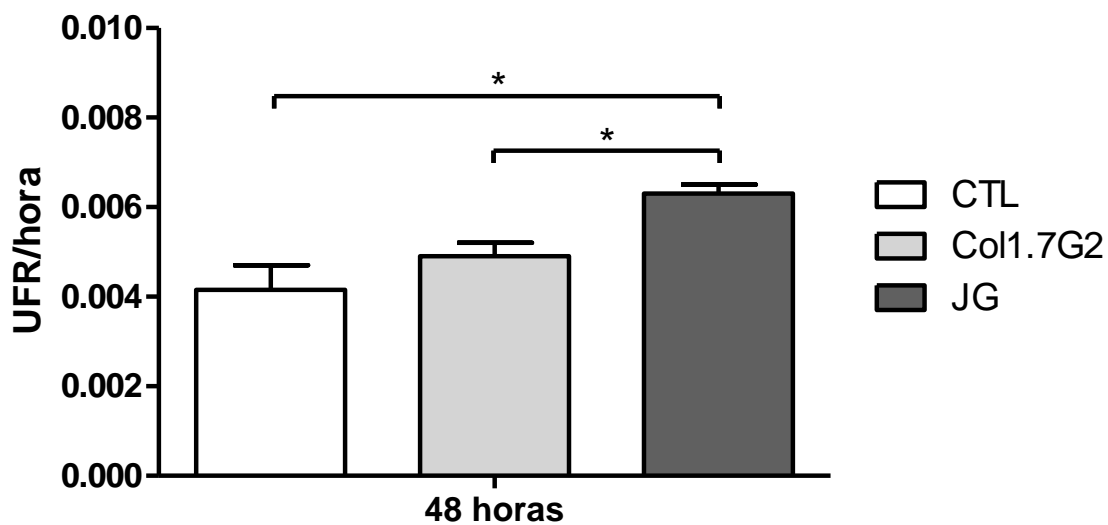


FIGURA 15 – Fluorescência relativa de CM-H2DCFDA oxidada presente em culturas de cardiomiócitos humanos derivadas de iPSCs, 48 horas após a infecção com Col1.7G2 ou JG. Culturas de cardiomiócitos humanos provenientes de iPSCs não infectadas mantidas pelos mesmos tempos foram usadas como controle (CTL). Os dados representam a média de duplicatas \pm o erro padrão da média (EPM). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($* p < 0,05$ – Teste t de Student).

3.10 Tratamento com catalase compromete o desenvolvimento intracelular de JG em cardiomiócitos humanos

Como observado para as culturas primárias de cardiomiócitos de camundongo, as culturas de cardiomiócitos humanos mostraram-se mais suscetíveis ao crescimento da cepa JG (Figura 14B), bem como apresentaram maior produção de ROS em relação as mesmas culturas infectadas com Col1.7G2 (Figuras 15). Dessa forma, decidimos investigar se a inibição do estresse oxidativo por tratamento das culturas com catalase também poderia interferir com o desenvolvimento intracelular de JG nas culturas de cardiomiócitos humanos.

Para isso, culturas de cardiomiócitos humanos provenientes de iPSCs foram incubadas com catalase, de acordo com o descrito na metodologia. Pudemos observar que o tratamento com catalase não promoveu alterações significativas nas taxas de invasão celular para as duas populações clonais, JG e Col1.7G2 (Figura 16A), quando comparado com os dados obtidos para culturas não tratadas com catalase (Figura 14A). As células humanas foram mais invadidas pelo clone Col1.7G2 em comparação a cepa JG. Foram observadas cerca de 1,7 vezes mais células infectadas em culturas expostas à Col1.7G2 em relação àquelas expostas à JG. Também não foi observada alteração significativa na taxa de desenvolvimento intracelular de Col1.7G2 em culturas infectadas e tratadas com catalase (Figura 16B), em relação as mesmas cultuas infectadas com Col1.7G2 e não submetidas ao tratamento com esta enzima (Figura 14B). Contudo, foi observada uma alteração significativa na taxa de crescimento intracelular de JG após o tratamento com catalase. Culturas de cardiomiócitos humanos tratadas com catalase e submetidas à infecção com JG apresentaram número baixo de parasitos intracelulares, inferior ao obtido para as mesmas culturas infectadas com JG e não tratadas (Figura 14B) ou tratadas com catalase e infectadas com Col1.7G2 (Figura 16B). Para culturas tratadas com catalase o número de parasitos intracelulares por célula em culturas infectadas com JG foi cerca de seis vezes maior do que aquele obtido para culturas infectadas com Col1.7G2 e tratadas com catalase, no tempo de 72 horas. Estes resultados sugerem que o estresse oxidativo gerado pela infecção desempenha papel importante no desenvolvimento intracelular da cepa JG.

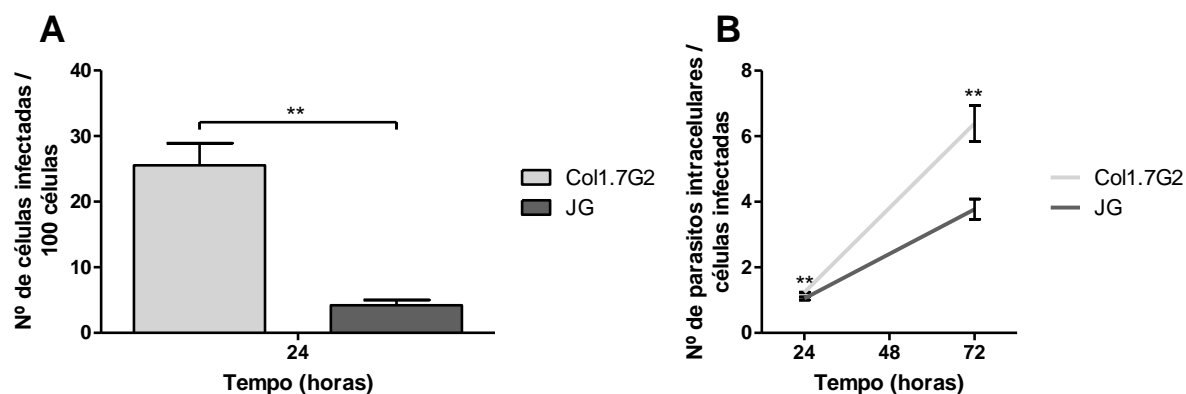


FIGURA 16 – (A-B) Quantificação das taxas de invasão e multiplicação intracelular de Col1.7G2 e JG em culturas de cardiomiócitos humanos tratadas com catalase. Culturas de cardiomiócitos humanos provenientes de iPSCs foram tratadas com catalase e então expostas à Col1.7G2 ou JG e o número de células infectadas por 100 células (A), bem como o número de parasitos intracelulares por célula infectada (B), foram avaliados para a determinação da taxa de invasão e multiplicação intracelular, respectivamente. Os dados representam a média de triplicatas \pm o erro padrão da média (EPM). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (** $p \leq 0,01$ – Teste t de Student).

3.11 Infecção em fibroblastos imortalizados de camundongo não gera estresse oxidativo e o perfil de crescimento intracelular é similar entre JG e Col1.7G2

Após avaliar a infecção de JG e Col1.7G2 em cardiomiócitos primários de camundongos BALB/c e também em cardiomiócitos humanos provenientes da diferenciação de iPSCs, decidimos observar se o mesmo perfil de crescimento diferencial era observado para outros tipos celulares. Para isso, realizamos infecções em fibroblastos embrionários imortalizados provenientes de camundongo e avaliamos o crescimento intracelular de JG e Col1.7G2 neste tipo celular.

A figura 17A mostra o número de parasitos intracelulares por célula infectada ao longo de um período total de 72 horas de infecção. Como pode ser observado, não há diferença significativa no número de parasitos intracelulares entre Col1.7G2 e JG em nenhum dos pontos analisados, sendo a curva de crescimento de ambos, muito próxima entre elas.

Uma vez que não foi observada diferença na taxa de crescimento intracelular de JG e Col1.7G2 neste tipo celular, decidimos avaliar a indução de estresse oxidativo nestas culturas após a infecção. Para isso, fizemos a infecção de fibroblastos com JG ou Col1.7G2 e avaliamos a produção de ROS novamente utilizando a sonda CM-H₂DCFDA adicionada à culturas controle ou infectadas, de acordo com o descrito na metodologia. A medida dos níveis de fluorescência foi realizada no tempo de 48 horas após a infecção. No tempo 48 horas após a infecção, tanto as culturas infectadas com Col1.7G2 ou JG apresentaram níveis semelhantes na produção de espécies reativas de oxigênio (Figura 17B) e não houve diferença entre as células infectadas e o grupo controle (Figura 17B).

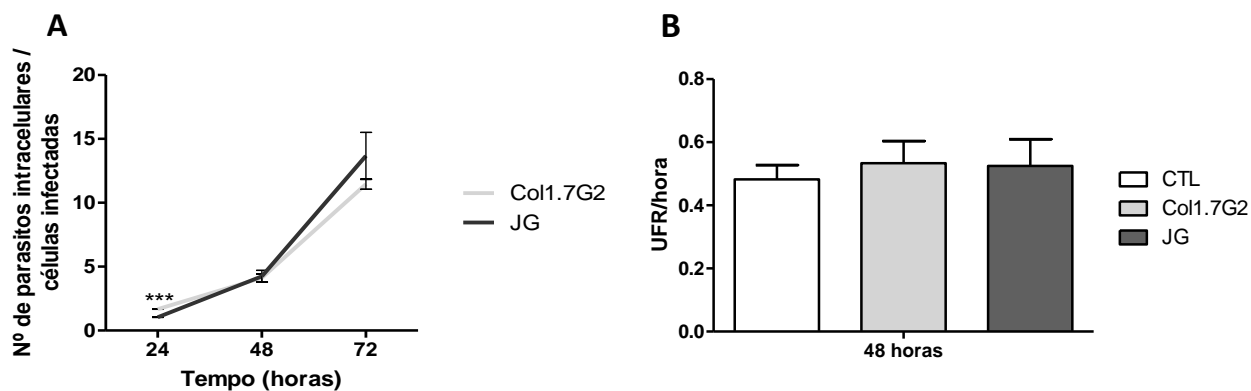


FIGURA 17 – (A) Quantificação das taxas de multiplicação intracelular de Col1.7G2 e JG em culturas de fibroblastos embrionários de camundongo (WTCL3). As culturas de fibroblastos foram expostas a Col1.7G2 ou JG e o número de parasitos intracelulares por célula infectada foi avaliado. Os dados representam a média dos triplicados \pm o erro padrão da média (EPM). (B) Fluorescência relativa de CM-H2DCFDA oxidado presente em culturas de fibroblastos, 48 horas após a infecção com Col1.7G2 ou JG. As culturas de fibroblastos não infectados mantidos durante o mesmo tempo foram utilizadas como controle (CTL). Os dados representam a média das triplicatas \pm o erro padrão da média (EPM).

3.12 Epimastigotas da cepa JG apresentam maiores níveis de Ca^{2+} intracelular após tratamento com H_2O_2

Os resultados anteriores sugerem que o estresse oxidativo pode ter papel relevante no desenvolvimento intracelular do parasito podendo, em situações específicas ser benéfico para sua multiplicação intracelular. Já foi demonstrado na literatura que o aumento nos níveis de Ca^{2+} intracelular, livre no citoplasma, em *Trypanosoma cruzi* pode representar um sinalizador importante, levando por exemplo ao aumento na capacidade infectiva deste parasito (MORENO *et al.*, 1994). Também foi recentemente demonstrado que a diminuição de expressão de receptores IP3 no parasito leva à diminuição não só da infectividade, mas do crescimento intracelular do *T. cruzi* (HASHIMOTO *et al.*, 2016). Dessa forma, resolvemos verificar se a exposição de Col1.7G2 e JG ao estresse oxidativo, por exposição à H_2O_2 , poderia induzir sinais de cálcio nestes parasitos. Para isso, foram realizadas medidas nos níveis basais de Ca^{2+} , prévios à exposição com H_2O_2 , e após o tratamento com H_2O_2 .

Os níveis basais de cálcio intracelular, antes do tratamento com H_2O_2 (controle), foram significativamente maiores para a cepa Col1.7G2 em relação à JG (Figura 18). Após o tratamento com a droga, a concentração de cálcio intracelular em Col1.7G2 foi menor que aquela obtido sem o tratamento. No entanto, para JG o tratamento levou à um aumento na concentração de cálcio intracelular livre no citoplasma (Figura 18). Estes resultados demonstram que somente JG é capaz de aumentar seus níveis de cálcio após o tratamento com H_2O_2 como observado em *Trypanosoma brucei* (RIDGLEY; XIONG; RUBEN, 1999).

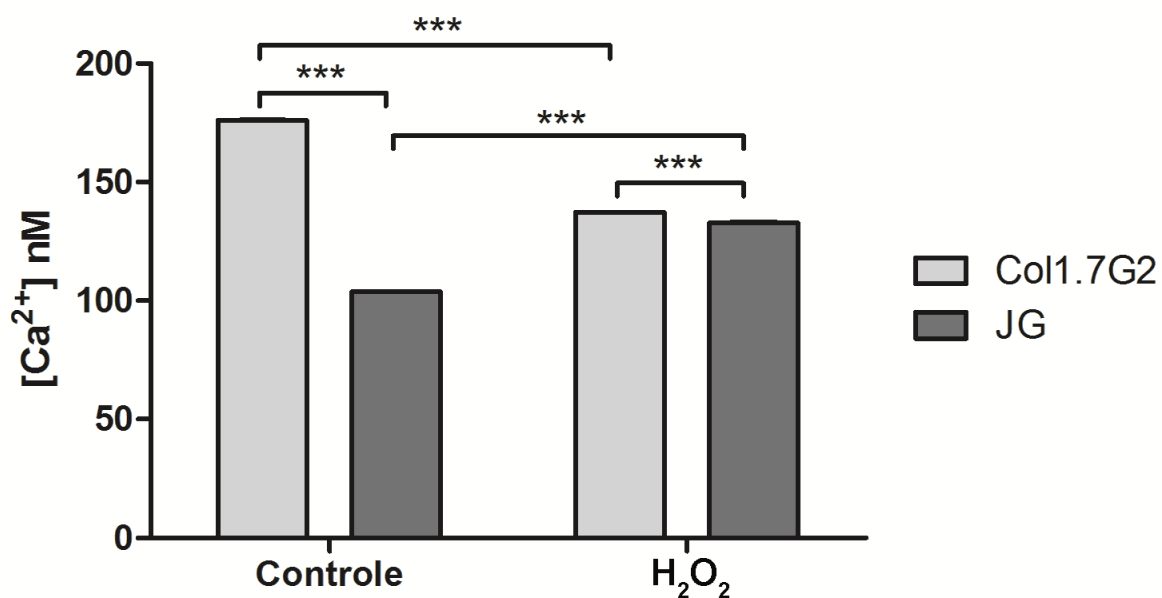


FIGURA 18 – Tratamento da forma epimastigota da cepa JG com H₂O₂, apresenta um aumento nos níveis de Ca²⁺ intracelular. 1x10⁷ formas epimastigotas de JG ou Col1.7G2, previamente incubadas com fura 2-AM, foram tratadas ou não (controle) com 30 μM de H₂O₂ por 30 minutos e os níveis de cálcio determinados. Os dados representam a média de triplicatas ± o erro padrão da média (EPM). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (***) p≤0,001 – Teste t de Student).

3.13 Epimastigotas da cepa JG apresentam maior produção $O_2^{\cdot-}$ após tratamento com H_2O_2

Outra importante molécula sinalizadora é o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Já foi demonstrado que em algumas situações $O_2^{\cdot-}$ pode funcionar como um importante estimulador do crescimento celular, bem como inibir vias apoptóticas (BUETLER, 2004; BLOOMFIELD; PEARS, 2003; PERVAIZ; CLÉMENT, 2002). Dessa forma, decidimos também investigar a influência do tratamento com H_2O_2 nos níveis de $O_2^{\cdot-}$ em formas epimastigotas de JG e Col1.7G2. Para isso, foram realizadas medidas dos níveis basais de $O_2^{\cdot-}$, antes do tratamento com H_2O_2 (controle), e após o tratamento com a droga.

Os níveis basais de $O_2^{\cdot-}$ para Col1.7G2 foram bem baixos, significativamente menores que aqueles observados para JG. Após o tratamento com H_2O_2 , esses níveis se tornaram indetectáveis (Figura 19A). Por outro lado, as análises de JG mostraram que os níveis basais de $O_2^{\cdot-}$ são naturalmente mais altos para essa população do parasito. Após o tratamento com H_2O_2 , pudemos observar um aumento significativo nos níveis $O_2^{\cdot-}$ em relação ao estado basal não tratado (Figura 19A).

Paralelamente, foi avaliada a quantidade de H_2O_2 liberada por formas epimastigotas de Col1.7G2 e JG antes e após o tratamento com H_2O_2 . Foi observado que os níveis de H_2O_2 liberados por formas epimastigotas de Col1.7G2 é naturalmente maior do que aquele observado para JG (Figura 19B). Após o tratamento, os níveis de H_2O_2 liberados por Col1.7G2 foram significativamente mais baixos, comparados aos níveis pré-tratamento. Para JG, o tratamento não alterou os níveis de H_2O_2 liberados em relação aos níveis pré-tratamento (Figura 19B).

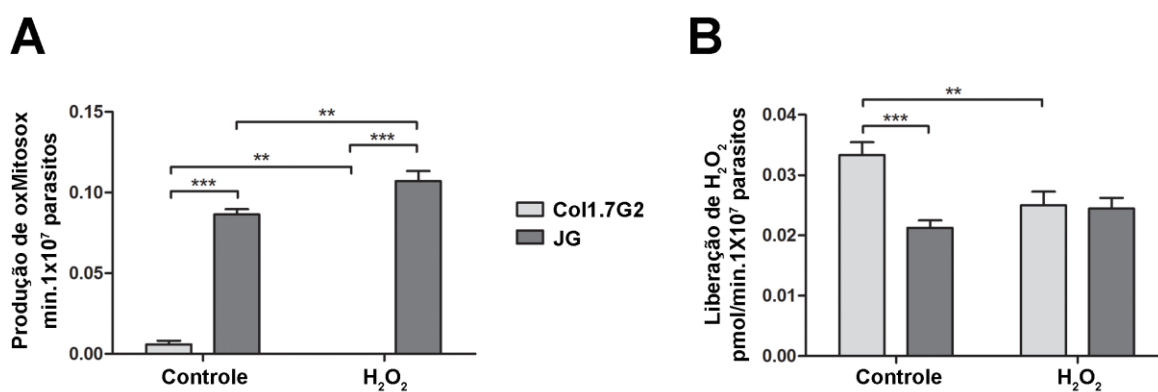


FIGURA 19 – Produção de ânion superóxido (A) e liberação de H₂O₂ (B) por formas epimastigotas de JG e Col1.7G2 antes e após o tratamento com H₂O₂. (A) Formas epimastigotas de JG e Col1.7G2 foram incubadas com MitoSOX e posteriormente expostas a 30 μ M de H₂O₂ por 30 minutos, o nível de oxMitoSOX foi mensurado em 10^7 parasitos. (B) Formas epimastigotas de JG e Col1.7G2 foram expostas a 30 μ M de H₂O₂ por 30 minutos e o nível de liberação de H₂O₂ foi mensurado em 10^7 parasitos. Os dados representam a média de triplicatas \pm o erro padrão da média (EPM). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ – Teste t de Student).

4 DISCUSSÃO

Entender os mecanismos envolvidos com a patogênese da doença de Chagas é de suma importância para o melhor controle da infecção. Tem sido demonstrado na literatura que a variabilidade clínica pode estar relacionada a um tropismo tecidual diferencial de populações do *Trypanosoma cruzi* (AMARAL *et al.*, 1975; VAGO *et al.*, 1996; ANDRADE *et al.*, 1999; FREITAS *et al.*, 2009; MACEDO; PENA, 1998; VAGO *et al.*, 2000; SALES-CAMPOS *et al.*, 2015). Adicionalmente, foi demonstrado que este tropismo tecidual de *T. cruzi* está ligado diretamente à interação parasito-célula hospedeira, sem nenhuma interferência do sistema imune (ANDRADE *et al.*, 2010). Nesse estudo por Andrade e colaboradores (2010) foi demonstrado que a multiplicação intracelular do parasito parece ser fundamental para a definição desse tropismo diferencial (ANDRADE *et al.*, 2010).

Dessa forma, no presente estudo decidimos avaliar a resposta da célula hospedeira à infecção, tentando correlacionar estes dados com o desenvolvimento intracelular do *T. cruzi*. Como modelo de estudo, utilizamos a infecção *in vitro* de cardiomiócitos pelas populações clonais Col1.7G2 (*T. cruzi* I) e JG (*T. cruzi* II). A escolha do tipo celular e das populações do parasito se deve ao fato de que, como mencionado na introdução deste trabalho, já havia sido demonstrado um comportamento diferencial dessas duas populações clonais de *T. cruzi* tanto *in vivo* quanto *in vitro* (ANDRADE *et al.*, 1999; ANDRADE *et al.*, 2010). Em infecções experimentais mistas em camundongos BALB/c, utilizando uma mistura de JG e Col1.7G2, havia sido observado que JG tinha tropismo acentuado pelo coração, sendo encontrado preferencialmente neste tecido em detrimento de Col1.7G2. Por outro lado, Col1.7G2 era encontrado em maior quantidade em todos os outros tecidos estudados (reto, diafragma, esôfago e sangue), em relação à JG (ANDRADE *et al.*, 1999). Posteriormente, a avaliação da infecção *in vitro* em cardiomiócitos isolados confirmou a maior adaptação de JG à infecção nesta linhagem celular quando comparado à Col1.7G2 (ANDRADE *et al.*, 2010).

Como observado nos dados obtidos anteriormente por Andrade e colaboradores (2010), um comportamento diferencial dessas duas populações clonais do parasito foi observado após a infecção nos cardiomiócitos primários obtidos de camundongos neonatos BALB/c, tanto em relação à invasão, quanto em relação à multiplicação intracelular. Com relação à invasão, os dados obtidos aqui

divergiram dos dados obtidos por Andrade e colaboradores (2010). Esta divergência pode estar relacionada ao fato de que, embora provenientes do mesmo espécie de animal, no trabalho desenvolvido por Andrade e colaboradores foi usada uma cultura de cardiomiócitos obtidos de embriões de camundongos BALB/c, onde o estado de diferenciação dessas células é distinto daquele de células obtidas de camundongos neonatos, podendo haver diferenças na expressão de proteínas entre estas duas células (KOBAN *et al.*, 1998). No entanto, apesar de a cepa JG apresentar maior capacidade de invasão em cardiomiócitos primários neonatos, as infecções com esta população do *T. cruzi* apresentaram maior taxa de multiplicação quando comparado a culturas infectadas com Col1.7G2. Estes dados reforçam a ideia de que o desenvolvimento intracelular do parasito, assim como sugerido por Andrade e colaboradores (2010), pode ser mais importante para a determinação do tropismo tecidual do parasito do que necessariamente só a invasão celular. Os dados obtidos com a infecção em culturas de cardiomiócitos humanos derivados de iPSCs corroboram esses achados, uma vez que para estas células a taxa de invasão pelo clone Col1.7G2 foi maior em comparação a cepa JG. No entanto, o crescimento intracelular foi maior para as infecções com JG, resultados semelhantes ao descrito na literatura para cardiomiócitos embrionários de camundongos BALB/c (ANDRADE *et al.*, 2010).

Vários fatores poderiam afetar o desenvolvimento intracelular do *T. cruzi*, dentre eles seu tráfego intracelular, bem como a resposta da célula à infecção por este parasito. Dessa forma, neste estudo decidimos investigar alguns destes fatores e suas possíveis interferências com a multiplicação intracelular das duas populações clonais do *T. cruzi*, Col1.7G2 e JG, em culturas de cardiomiócitos.

Primeiramente investigamos se o tráfego intracelular do *T. cruzi* poderia ser distinto entre JG e Col1.7G2 e se isso influenciaria no processo de multiplicação intracelular destas populações do parasito nas culturas de cardiomiócitos. O parasito invade a célula através da formação de um vacúolo parasitóforo e depois escapa deste vacúolo para se transformar na forma amastigota e iniciar seu processo de multiplicação intracelular. Sabe-se que o tempo de escape do vacúolo pode variar em linhagens celulares diferentes (LEY *et al.*, 1990; AGUIAR *et al.*, 2013; ANDRADE; ANDREWS, 2004). Sendo assim, seria possível que um escape mais rápido, adiantaria a transformação do tripomastigota em amastigota e com isso o parasito iniciaria sua multiplicação mais cedo. De fato, parasitos do *T. cruzi*

superexpressores de trans-sialidase, os quais escapam mais rápido de seus vacúolos parasitóforos, se transformam mais cedo na forma amastigota, quando comparado com parasitos selvagens (RUBIN-DE-CELIS *et al.*, 2006). Além disso, um maior tempo de exposição ao vacúolo com conteúdo ácido poderia ter influência sobre o parasito, alterando sua capacidade replicativa. Nossos dados mostraram que não houve diferença na taxa de escape do vacúolo parasitóforo para Col1.7G2 e JG. Mesmo não havendo diferença no tempo de permanência no vacúolo parasitóforo para ambas as populações clonais, JG ainda assim apresenta um maior crescimento intracelular. Estes dados sugerem que o escape do vacúolo não interfere com a multiplicação intracelular, podendo haver outros fatores que interferem com esse fenótipo. Outros dados da literatura corroboram estes achados. Aguiar e colaboradores (2013) estudando o efeito da superexpressão de MutT em *T. cruzi*, uma enzima envolvida no reparo de DNA, mostrou que estes parasitos não diferem na taxa de invasão, ainda assim apresentam diferentes taxas de multiplicação intracelular.

Além do escape do vacúolo a resposta celular à infecção poderia interferir com o crescimento do *T. cruzi*. Assim, posteriormente investigamos se a resposta celular a infecção, através da produção de citocinas e/ou espécies reativas de oxigênio, poderia estar influenciando no crescimento intracelular diferencial de JG e Col1.7G2.

Citocinas, como TNF- α e IL-1 β , foram detectadas em cardiomiócitos infectados com *T. cruzi* (MACHADO *et al.*, 2000). Estas citocinas junto com IFN- γ se mostraram importantes para a indução de óxido nítrico, um fator importante na indução de estresse oxidativo e para a regulação da infecção pelo parasito (MACHADO *et al.*, 2000). Ba e colaboradores (2010) mostraram ainda que a infecção de cardiomiócitos com *T. cruzi* leva à secreção de TNF- α e IL-1 β por essas células em resposta à produção de ROS e ativação de PARP-1. Nas infecções realizadas aqui não fomos capazes de detectar níveis significativos de produção de TNF- α e das outras citocinas analisadas, com exceção de IL-6. Talvez isso se deva ao fato de que as taxas de infecção dos cardiomiócitos para ambas as populações clonais do parasito, JG e Col1.7G2, não foi alta. Apenas 10-20% de células apresentaram-se infectadas. Dessa forma, o montante de citocina produzida e secretada pode ter sido diluído. Adicionalmente, no trabalho de Ba e colaboradores

(2010) o efeito da produção de ROS na indução da expressão de citocinas ocorreu nas primeiras horas após à infecção e aqui foram avaliadas citocinas no sobrenadante de culturas após 24, 48 ou 96 horas de infecção, o que poderia também ter contribuído para as diferenças encontradas. A única citocina avaliada nas primeiras horas após a exposição aos parasitos foi TGF- β , a qual foi feita pela quantificação da expressão de RNA mensageiro para esta citocina. TGF- β tem se mostrado de grande importância para a infecção e a conclusão do ciclo celular do *Trypanosoma cruzi* (WAGHABI *et al.*, 2007). No entanto, os dados obtidos foram muito variáveis não sendo possível identificar diferenças importantes entre a infecção com JG ou Col1.7G2. Com relação à IL-6, esta foi a única citocina significativamente expressa nas culturas infectadas com JG ou Col1.7G2. O aumento na produção da citocina IL-6 por células cardíacas em decorrência da exposição ao *Trypanosoma cruzi* já havia sido demonstrado (PONCE *et al.*, 2012). IL-6 é uma citocina pró-inflamatória e normalmente com alta expressão após a infecção celular. Este aumento de IL-6 poderia justificar o quadro de inflamação mais proeminente encontrado no coração de camundongos infectados com JG (ANDRADE *et al.*, 1999).

Apesar de não termos encontrado diferenças significativas na produção de citocinas, observamos diferenças importantes na indução de estresse oxidativo em culturas infectadas com JG ou Col1.7G2. Gupta e colaboradores (2009) mostraram que a infecção de cardiomiócitos com *T. cruzi* leva a um distúrbio no potencial de membrana da mitocôndria gerando espécies reativas de oxigênio. De fato, com o uso da sonda CM-H₂DCFDA, observamos um aumento na produção de ROS nas culturas de cardiomiócitos primários e cardiomiócitos humanos infectadas com Col1.7G2 ou JG, 48 horas após infecção, quando comparado a culturas controle não infectadas. A análise do índice de controle respiratório, que define a capacidade de funcionamento da mitocôndria celular, reforça os dados obtidos para a medida da geração de ROS, uma vez que culturas primárias de cardiomiócitos de camundongo infectadas com JG apresentaram maior comprometimento mitocondrial após 48 horas de infecção do que culturas controle e culturas infectadas com Col1.7G2. Altos índices do controle respiratório indicam bom funcionamento da mitocôndria, enquanto que baixos índices indicam disfunção da mesma (BRAND; NICHOLLS, 2011). De fato, como demonstrado por Gupta e colaboradores (2009), o comprometimento da mitocôndria com ineficiência na cadeia transportadora de

elétrons, gerado pela infecção pelo *T. cruzi*, leva à geração de espécies reativas de oxigênio em cardiomiócitos. O *Trypanosoma cruzi*, por sua vez possui um sistema sofisticado de defesas antioxidantes (PIACENZA *et al.*, 2013). Ao avaliarmos expressão de enzimas anti-oxidantes, para maior proteção contra o estresse oxidativo, verificamos que JG gera maior estresse oxidativo nos cardiomiócitos, mas não apresenta níveis mais elevados de enzimas anti-oxidantes (APX, MPX, SODA, SODB, TR e TS) em relação à Col1.7G2. A expressão destas enzimas foi menor (APX, MPX, TR e TS) ou igual (SODA e SODB) a Col1.7G2 em uma ou mais formas do ciclo de vida do parasito. Estes achados corroboram dados prévios da literatura que demonstram que a cepa Colombiana apresenta altas concentrações de enzimas antioxidantes (PIACENZA *et al.*, 2009). A maior expressão de enzimas anti-oxidantes em Col1.7G2 foi observada mesmo após submissão do parasito à uma condição de estresse oxidativo por exposição à H_2O_2 . Embora já havia sido mostrado na literatura que a incubação prévia com H_2O_2 pode alterar a produção de enzimas antioxidantes nas diferentes formas do parasito *T. cruzi* (GADELHA *et al.*, 2013; PIACENZA *et al.*, 2009), nestas condições Col1.7G2 ainda apresentou maior quantidade de enzimas antioxidantes, como MPX, SODB, TR e TS, quando comparado à JG. Dados da literatura demonstram que o aumento de espécies reativas de oxigênio podem comprometer o crescimento intracelular de diversos patógenos (MURRAY *et al.*, 1985; FONSECA-SILVA *et al.*, 2011; CIFANI *et al.*, 2013; NOVAIS *et al.*, 2014). Dessa forma, a princípio seria de se esperar que o crescimento intracelular de JG fosse menor, e não maior que Col1.7G2, como observado. No entanto, recentemente foi demonstrado que o estresse oxidativo gerado pela infecção com o *T. cruzi* pode levar a um aumento na taxa de replicação deste parasito (PAIVA *et al.*, 2012; GOES *et al.*, 2016). Uma das possíveis explicações para esse aumento na taxa de replicação induzida pelo estresse oxidativo poderia ser a biodisponibilidade de ferro para uso pelo parasito (PAIVA *et al.*, 2012; ANDREWS, 2012). Sabe-se que o ferro é importante para vários eventos metabólicos, como replicação do DNA, respiração mitocondrial e defesa anti-oxidante (TAYLOR; KELLY, 2010). Assim, embora tenha sido mostrado que formas amastigotas do parasito sejam capazes de se ligar e importar transferrina (LIMA; VILLALTA, 1990), no ambiente intracelular a concentração desta proteína é muito baixa. É possível que ferro livre seja adquirido mais facilmente por esta forma e então contribua para uma melhor adaptação deste parasito ao ambiente intracelular.

No caso de tripanosomatídeos, as superóxido dismutases, importantes enzimas antioxidantes, são dependentes de ferro (DUFERNEZ *et al.*, 2006). Alternativamente, a presença de estresse oxidativo poderia gerar sinais específicos que contribuíssem para uma resposta mais adequada do parasito na célula, estimulando sua maior replicação. De fato, Finzi e colaboradores (2004) também mostraram que o pré-tratamento da forma epimastigota do *T. cruzi* com baixas concentrações de peróxido de hidrogênio aumentou a proliferação dos parasitos. Adicionalmente, outros estudos mostraram que uma linhagem recombinante de *T. cruzi*, superexpressora de MutT (uma enzima envolvida no reparo de DNA), é mais eficiente na colonização celular em comparação com parasitos selvagens, sendo sugerido que 8-oxo-GMP, gerado a partir da degradação de 8-oxo-GTP por MutT, poderia servir como sinalização para produzir parasitos mais adaptados ao ambiente intracelular (AGUIAR *et al.*, 2013). Goes e colaboradores (2016) viram também que baixas concentrações de ROS foram suficientes para promover uma melhor infecção em experimentos *in vitro* e *in vivo* reforçando ainda mais que ROS tem um papel sinalizador para a infecção celular pelo *T. cruzi*. Estes dados, juntamente com os dados de que a inibição do estresse oxidativo pelo tratamento prévio das células com catalase abole o maior crescimento intracelular de JG em relação a Col1.7G2 em cardiomiócitos, reforçam a hipótese de que também para células não-fagocíticas profissionais a produção de ROS pode funcionar como um sinalizador importante para a multiplicação intracelular do *T. cruzi*, assim como observado anteriormente para macrófagos (PAIVA *et al.*, 2012). Outro dado que reforça esta teoria, é o fato de não termos encontrado diferença na multiplicação intracelular de JG e Col1.7G2 após a infecção em fibroblastos, os quais não respondem a infecção com produção de ROS. Sendo assim a presença de ROS poderia estar direta ou indiretamente estimulando o crescimento intracelular do *T. cruzi*.

Há vários dados na literatura mostrando que a presença de estresse oxidativo poderia gerar moléculas sinalizadoras. Uma das moléculas sinalizadoras mais importantes para a célula é o cálcio. Este íon é um mensageiro primordial, pois participa de vários processos celulares como secreção de vesículas, diferenciação e proliferação celular (GILON *et al.*, 2014; HAO *et al.*, 2016; THARMALINGAM; WU; HAMPSON, 2016). Ainda, qualquer desbalanço neste íon pode influenciar na indução de morte celular através de apoptose e necrose (ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2011). Após o tratamento com H₂O₂, observamos uma queda nos

níveis de cálcio intracelular em Col1.7G2, enquanto foi observado um aumento do Ca^{2+} em JG. Como já descrito por Moreno e colaboradores (1994) e Tardieux, Nathanson e Andrews (1994), o aumento do Ca^{2+} intracelular no parasito bem como, no citoplasma da célula hospedeira, é importante para o processo de invasão celular, demonstrando que o parasito pode responder ao ambiente externo com variações no nível de cálcio intracelular, alterando seu comportamento. Adicionalmente, foi mostrado que em epimastigotas a regulação do cálcio intracelular é importante para a multiplicação e metaciclogênese (LAMMEL *et al.*, 1996). Na literatura foi também mostrado que espécies reativas de oxigênio, são capazes de levar ao aumento do Ca^{2+} intracelular em parasitos como *Trypanosoma brucei brucei* (RIDGLEY; XIONG; RUBEN, 1999). Mostramos aqui, pela primeira vez, que *T. cruzi* também pode responder ao estresse oxidativo através da alteração nos níveis de cálcio intracelular. Neste caso, o aumento nos níveis de cálcio observado para JG não foi suficiente para indução de morte celular, mas poderia ser importante para sinalização de alguma via relacionada com proliferação celular.

Além do cálcio, a produção de peróxido de hidrogênio, e também do ânion superóxido foram averiguadas para as formas epimastigotas de Col1.7G2 e JG submetidas a um ambiente de estresse (na presença de H_2O_2). Com relação à liberação de H_2O_2 , não observamos diferenças significativas entre JG e Col1.7G2 após a exposição ao estresse oxidativo. Com relação ao ânion superóxido, Piacenza e colaboradores (2007) mostraram que o ânion superóxido tem papel central na sinalização para a iniciação do processo de morte celular programada em formas epimastigotas de *T. cruzi* submetidas ao estresse oxidativo, induzido por exposição ao soro humano. Pimentel e colaboradores (2001), também demonstraram que a geração de estresse oxidativo com aumento de ânion superóxido induz respostas apoptóticas em cardiomiócitos. No entanto, há outros relatos na literatura mostrando que o aumento na concentração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ pode sinalizar para aumento da proliferação celular, assim como funcionar como inibidor de vias apoptóticas (PERVAIZ *et al.*, 2002; BLOOMFIELD e PEARS, 2003; BUETLER *et al.*, 2004). Em *Dictyostelium discoideum*, por exemplo, a superexpressão de SOD, com consequente consumo de $\text{O}_2^{\cdot-}$, leva à uma inibição da formação de agregados multicelulares (PERVAIZ *et al.*, 2002). Em nosso trabalho, mostramos que a exposição de JG e Col1.7G2 ao H_2O_2 leva a um aumento dos níveis de $\text{O}_2^{\cdot-}$ apenas em JG. Ao contrário, há uma diminuição significativa da produção do superóxido nesse clone. É possível que a

elevação de $O_2^{\cdot -}$ possa também funcionar como um sinalizador para a proliferação celular. O que determinaria se este íon é responsável por morte ou proliferação certamente estaria relacionado à quantidade dele, onde concentrações moderadas poderiam ser benéficas enquanto altas concentrações poderiam induzir à morte celular.

5 CONCLUSÃO

Os dados apresentados aqui sugerem que a indução de estresse oxidativo, pelo menos em concentrações moderadas, pode auxiliar no crescimento do *T. cruzi* em células não-fagocíticas profissionais e que isso pode influenciar na colonização da célula hospedeira e no tropismo tecidual diferencial do parasito. Isso é indicado pelas seguintes conclusões:

- A cepa JG apresentou maior desenvolvimento intracelular em culturas de cardiomiócitos murinos e humanos;
- O maior crescimento de JG não é devido a um escape mais rápido do vacúolo parasitóforo em comparação a Col1.7G2;
- As culturas de cardiomiócitos primários de camundongos, bem como de cardiomiócitos humanos quando infectadas com a cepa JG produzem mais espécies reativas de oxigênio;
- A maior produção de ROS por cardiomiócitos primários infectados com JG é decorrente de uma disfunção mitocondrial;
- O clone Col1.7G2 possui mais enzimas antioxidantes em comparação a JG, mesmo após o tratamento com H₂O₂;
- A enzima catalase compromete o desenvolvimento intracelular de JG tanto em cardiomiócitos de murinos como também em cardiomiócitos humanos
- O H₂O₂ leva ao aumento de moléculas sinalizadoras, Ca²⁺ e O₂⁻, nas formas epimastigotas da cepa JG.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, P.H. *et al.* Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 6, p. 2279, 2013.
- ALVAREZ, M. N. *et al.* Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: Consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 8, p. 6627–6640, 2011.
- AMARAL, C. S. F.; TAFURI, W. L.; BRENER, Z. Frequência do parasitismo encefálico em camundongos experimentalmente infectados com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Rev Soc. Bras. Med. Trop**, v. 9, p. 243-246, 1975.
- ANDRADE, C. DE M. *et al.* Chagas disease: morbidity profile in an endemic area of Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 706–15, 2015.
- ANDRADE, L. O. *et al.* Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 163–172, 1999.
- ANDRADE, L. O. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Experimental Parasitology**, v. 100, n. 4, p. 269–275, 2002.
- ANDRADE, L.O. *et al.* Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 834, 2010.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal Fusion Is Essential for the Retention of *Trypanosoma cruzi* Inside Host Cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 200, n. 9, p. 1135–1143, 2004.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 819–823, 2005.
- ANDREWS, N. W. *et al.* Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 64, n. 3, p. 474–484, 1987.
- ANDREWS, N. W. From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 2, p. 471–475, 1994.
- ANDREWS, N.W. Oxidative stress and intracellular infections: more iron to the fire. **J Clin Invest**, v. 122, n. 7, p. 2352-2354, 2012.

ARAUJO, C.A.; P.J. WANIEK; A.M. JANSEN. An overview of Chagas disease and the role of triatomines on its distribution in Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 9, n. 3, p. 227-234, 2009.

AVILA, H. A. *et al.* Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 48, n. 2, p. 211–221, 1991.

BA, X. *et al.* *Trypanosoma cruzi* induces the reactive oxygen species-PARP-1-RelA pathway for up-regulation of cytokine expression in cardiomyocytes. **J Biol Chem**, v. 285, n. 15, p. 11596-11606, 2010.

BARROS, M. H. *et al.* Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 48, p. 49883-49888, 2004.

BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17. **Cytokine Kit Instruction Manual**. 2017. Disponível em: <https://wwwbdbiosciences.com/documents/CBA_MouseTh1Th2Th17_Kit_Manual.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2017.

BENHAR, M.; ENGELBERG, D.; LEVITZKI, A. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. **EMBO Reports**, v. 3, n. 5, p. 420-425, 2002.

BLOOMFIELD, G.; PEARS, C. Superoxide signalling required for multicellular development of *Dictyostelium*. **Journal of cell science**, v. 116, n. Pt 16, p. 3387–3397, 2003.

BRAGA, M. S. *et al.* Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 42, n. 3, p. 157–161, 2000.

BRAND, M. D.; NICHOLLS, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **The Biochemical journal**, v. 435, n. 2, p. 297–312, 2011.

BUETLER, T. M. Role of Superoxide as a Signaling Molecule. **News in Physiological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 120–123, 2004.

BURGOS, J. M. *et al.* Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 12, p. 1319–1327, 2007.

CALVET, C. M. *et al.* TGF- β receptor type II costameric localization in cardiomyocytes and host cell TGF- β response is disrupted by *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology**, v. 143, n. 6, p. 704–715, 2016.

CAMPBELL, D. A; WESTENBERGER, S. J.; STURM, N. R. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. **Current molecular medicine**, v. 4, n. 6, p. 549–62, 2004.

- CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L. V.; FERNANDES, J. F. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. **The Journal of Protozoology**, v. 14, n. 3, p. 447-451, 1967.
- CASTRO, A. *et al.* Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 88, n. 10, p. 894–900, 2002.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, 1909.
- CIFANI, N. *et al.* Reactive-oxygen-species-mediated *P. aeruginosa* killing is functional in human cystic fibrosis macrophages. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. 71717, 2013.
- CONTRERAS, V. T. *et al.* Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 1, p. 123–133, 1988.
- COSTALES, J. A.; DAILY, J. P.; BURLEIGH, B. A. Cytokine-dependent and-independent gene expression changes and cell cycle block revealed in *Trypanosoma cruzi*-infected host cells by comparative mRNA profiling. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 252, 2009.
- COURA, J. R. *et al.* Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 4, p. 171-176, 2002.
- COURA, J.R.; J.C. DIAS. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 31-40, 2009
- DIAS, J. C. P. *et al.* 2 nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. December, p. 3–60, 2016.
- DIOSQUE, P. *et al.* Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 997–1003, 2003.
- DUFERNEZ, F. *et al.* The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in trypanosomatidae: characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in *Trypanosoma brucei*. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 2, p. 210-225, 2006.
- DUTRA, W.O.; K.J. GOLLOB. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Curr Opin Infect Dis**, v. 21, n. 3, p. 287-292, 2008.

DVORAK, J. A.; HYDE, T. P. *Trypanosoma cruzi*: Interaction with vertebrate cells in vitro. I. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. **Experimental Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 268–283, 1973.

ESKELINEN, E. L. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. **Molecular Aspects of Medicine**, 2006.

FERNANDES, M. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. **The Journal of experimental medicine**, v. 208, n. 5, p. 909–21, 2011.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: A unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 6, p. 734-747, 2012.

FERREIRA, D. *et al.* Actin cytoskeleton-dependent and -independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 10, p. 5522–5528, 2006.

FINZI, J. *et al.* *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 133, p. 37-43, 2004.

FLORIÁN SANZ, F. *et al.* Miocardiopatía chagásica en España: un diagnóstico a tener en cuenta. **Anales de medicina interna (Madrid, Spain : 1984)**, v. 22, n. 11, p. 538–40, 2005.

FONSECA-SILVA, F. *et al.* Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. 14666, 2011.

FRANCO, D. J. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. **Experimental Parasitology**, v. 104, n. 1–2, p. 54–61, 2003.

FREITAS, J. M. *et al.* The MHC gene region of murine hosts influences the differential tissue tropism of infecting *Trypanosoma cruzi* strains. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, 2009.

GADELHA, F. R. *et al.* Release of the cytosolic tryparedoxin peroxidase into the incubation medium and a different profile of cytosolic and mitochondrial peroxiredoxin expression in H₂O₂-treated *Trypanosoma cruzi* tissue culture-derived trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 3, p. 287–293, 2013.

GILON, P. *et al.* Calcium signaling in pancreatic β -cells in health and in Type 2 diabetes. **Cell calcium**, v. 56, n. 5, p. 340–61, 2014.

GOES, G. R. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. **PLoS Negl Trop Dis**, 2016.

GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M.; TSIEN, R. Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 6, p. 3440-3450, 1985.

GUPTA, S. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. **Free radical biology & medicine**, v. 47, n. 10, p. 1414–1421, 2009.

GUTIÉRREZ-MARÍN, R. *et al.* Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic area. **Parasitology**, v. 129, n. Pt 4, p. 439–444, 2004.

HAO, B. *et al.* The role of Ca²⁺ signaling on the self-renewal and neural differentiation of embryonic stem cells (ESCs). **Cell Calcium**, v. 59, n. 2-3, p. 67-74, 2016.

HASHIMOTO, M. *et al.* Morpholino antisense oligo inhibits trans-splicing of pre-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mRNA of *Trypanosoma cruzi* and suppresses parasite growth and infectivity. **Parasitology International**, v. 65, n. 3, p. 175–179, 2016.

HELD, P. An Introduction to Reactive Oxygen Species: Measurement of ROS in Cells. **BioTek Instruments**, 2015. Disponível em: <<http://www.biotek.com/resources/articles/reactive-oxygen-species.html>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

HISSA, B. *et al.* Membrane cholesterol regulates lysosome-plasma membrane fusion events and modulates *Trypanosoma cruzi* invasion of host cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, 2012.

HOUSTON-LUDLAM, G. A.; BELEW, A. T.; EL-SAYED, N. M. Comparative transcriptome profiling of human foreskin fibroblasts infected with the Sylvio and Y strains of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, 2016.

IRIGOÍN, F. *et al.* Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 6, p. 733-742, 2008.

JACKSON, Y. *et al.* Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas disease among Latin American migrants in Geneva, Switzerland. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 2, p. e592, 2010.

KLAUNIG, J. E. *et al.* Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, n. 2, p. 86–99, 2011.

KOBAN, M. U. *et al.* Expressional analysis of the cardiac Na-Ca exchanger in rat development and senescence. **Cardiovascular research**, v. 37, n. 2, p. 405–423, 1998.

KRUMOVA, K.; COSA, G. Overview of Reactive Oxygen Species. In: NONELL, S.; FLORS, C. (Ed.). **Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences**. Volume 1. 2016. Cap. 1, p. 1-21.

LAGES-SILVA, E. *et al.* Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2167–2171, 2006.

LAMMEL, E. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: involvement of intracellular calcium in multiplication and differentiation. **Experimental parasitology**, v. 83, n. 2, p. 240–9, 1996.

LANDRY, W. D.; COTTER, T. G. ROS signalling, NADPH oxidases and cancer. **Biochemical Society transactions**, v. 42, n. 4, p. 934–8, 2014.

LESCURE, F. X. *et al.* Chagas disease, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 644–646, 2008.

LEY, V. *et al.* The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. **J. Exp. MED**, v. 171, p. 401–413, 1990.

LI, Y. *et al.* Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 4, 2016.

LIMA, M.F.; VILLALTA, F. *Trypanosoma cruzi* receptors for human transferrin and their role. **Mol Biochem Parasitol**, v. 38, n. 2, p. 245-252, 1990.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LUQUETTI, A. O. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 80, n. 3, p. 462–470, 1986.

MACEDO, A.M.; PENA, S.D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitol Today**, v. 14, p. 3, p. 119, 1998.

MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. **Expert Rev Mol Med**, v. 4, n. 5, p. 1-16, 2002.

MACEDO, A.M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 1-12, 2004.

MACHADO, F. S. *et al.* *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, v. 102, n. 24, p. 3003–3008, 2000.

- MANQUE, P. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection induces a global host cell response in Cardiomyocytes. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 5, p. 1855–1862, 2011.
- MARTINS, N. O. *et al.* Molecular Characterization of a Novel Family of *Trypanosoma cruzi* Surface Membrane Proteins (TcSMP) Involved in Mammalian Host Cell Invasion. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 11, 2015.
- MATEO, H. *et al.* Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 271–276, 2008.
- MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **The Journal of parasitology**, v. 64, n. 3, p. 475–482, 1978.
- MILES, M. A *et al.* The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 1509–1528, 2009.
- MORENO, S. N. *et al.* Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 4, p. 1353-1540, 1994.
- MORAES, K. C. M.; DINIZ, L. F.; BAHIA, M. T. Role of cyclooxygenase-2 in *Trypanosoma cruzi* survival in the early stages of parasite host-cell interaction. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 181–191, 2015.
- MUÑOZ, J. *et al.* Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: Immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). **Acta Tropica**, v. 111, n. 1, p. 51–55, 2009.
- MURRAY, H.W. *et al.* Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, v. 134, n. 3, p. 1982-1988, 1985.
- NOVAIS, F.O. *et al.* Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. **J Infect Dis**, v. 209, n. 8, p. 1288-1296, 2014.
- NÜSSE, O. Biochemistry of the phagosome: the challenge to study a transient organelle. **The Scientific World Journal**, v. 11, p. 2364–81, 2011.
- OLIVEIRA, R. P. *et al.* Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 7, p. 3776–3780, 1998.
- PAIVA, C. N. *et al.* Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 7, p. 2531–2542, 2012.

PANTANO, C. *et al.* Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 9–10, p. 1791–806, 2006.

PELOSO E. F. *et al.* Tryparedoxin peroxidases and superoxide dismutases expression as well as ROS release are related to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes growth phases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 520, n. 2, p. 117–122, 2012.

PERVAIZ, S.; CLÉMENT, M.-V. A permissive apoptotic environment: function of a decrease in intracellular superoxide anion and cytosolic acidification. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 290, n. 4, p. 1145–1150, 2002.

PIACENZA, L. *et al.* Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. **The Biochemical journal**, v. 403, n. 2, p. 323–34, 2007.

PIACENZA, L. *et al.* Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. **The Biochemical journal**, v. 410, n. 2, p. 359–68, 2008.

PIACENZA, L. *et al.* Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 13, p. 1455–1464, 2009.

PIACENZA, L. *et al.* *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 7, p. 723–34, 2013.

PIMENTEL, D. R. *et al.* Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes. **Circulation research**, v. 89, n. 5, p. 453–460, 2001.

PIÑEYRO, M. D. *et al.* Crystal structure of the tryparedoxin peroxidase from the human parasite *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Structural Biology**, v. 150, n. 1, p. 11–22, 2005.

PIRARD, M. *et al.* The validity of serologic tests for *Trypanosoma cruzi* and the effectiveness of transfusional screening strategies in a hyperendemic region. **Transfusion**, v. 45, n. 4, p. 554–561, 2005.

PONCE, E. N. *et al.* Toll-like receptor-2 and interleukin-6 mediate cardiomyocyte protection from apoptosis during *Trypanosoma cruzi* murine infection. **Med Microbiol Immunol**, v. 201, p. 145, 2012.

PORTER, K. E.; TURNER, N. A. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 123, n. 2, p. 255–278, 2009.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2001.

RADA, B.; LETO, T. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox Family NADPH oxidases. **Contributions to Microbiology**, v. 15, p. 164-187, 2008.

RAMÍREZ, J. D. *et al.* Molecular Epidemiology of Human Oral Chagas Disease Outbreaks in Colombia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, 2013.

RANKIN, E. B.; GIACCIA, A. J. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. **Cell death and differentiation**, v. 15, n. 4, p. 678–85, 2008.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

RIDGLEY, E. L.; XIONG, Z. H.; RUBEN, L. Reactive oxygen species activate a Ca²⁺-dependent cell death pathway in the unicellular organism *Trypanosoma brucei*. **The Biochemical journal**, v. 340, p. 33–40, 1999.

RODRÍGUEZ, A. *et al.* A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. **Journal of Cell Biology**, v. 129, n. 5, p. 1263–1273, 1995.

RODRIGUEZ, A *et al.* Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule /kinesin-mediated transport. **J. Cell Biol.**, v. 134, n. 2, p. 349–362, 1996.

RODRÍGUEZ, A. *et al.* cAMP regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome- mediated cell invasion by trypanosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 24, p. 16754–16759, 1999.

ROMA, E. H. *et al.* Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in *Leishmania amazonensis* infection. **Parasites & vectors**, v. 9, p. 193, 2016.

RUBIN-DE-CELIS, S.S. *et al.* Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 12, p. 1888, 2006.

RUIZ, R. C. *et al.* Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. **The Biochemical journal**, v. 330, Pt. 1, p. 505–11, 1998.

SALES-CAMPOS, H. *et al.* *Trypanosoma cruzi* DTU TcII presents higher blood parasitism than DTU TcI in an experimental model of mixed infection. **Acta Parasitologica**, v. 60, n. 3, p. 435–441, 2015.

SALOMON, C. J. First century of Chagas' disease: An overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2012.

SCHMUNIS, G.A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 78-85, 2007.

- SOARES, M. J. *et al.* A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology research**, v. 75, n. 7, p. 522–7, 1989.
- TAM, C. *et al.* Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. **Journal of Cell Biology**, v. 189, n. 6, p. 1027–1038, 2010.
- TAYLOR, M.C.; KELLY, J.M. Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. **Parasitology**, v. 137, n. 6, p. 899-917, 2010.
- TARDIEUX, I. *et al.* Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 71, n. 7, p. 1117–1130, 1992.
- TARDIEUX, I.; NATHANSON, M. H.; ANDREWS, N. W. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 3, p. 1017–22, 1994.
- TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* Chagas disease. **Postgraduate medical journal**, v. 82, n. 974, p. 788–98, 2006.
- THARMALINGAM, S.; WU, C.; HAMPSON, D. R. The calcium-sensing receptor and integrins modulate cerebellar granule cell precursor differentiation and migration. **Developmental Neurobiology**, v. 76, n. 4, p. 375–389, 2016.
- TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 1, p. 85–104, 1998.
- TRAJILLO, M. *et al.* *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* trypanothione peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 33, p. 34175–34182, 2004.
- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n.5-6, p. 472-481, 2001
- VAENA DE AVALOS, S. *et al.* Immediate/early response to *Trypanosoma cruzi* infection involves minimal modulation of host cell transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 1, p. 639–644, 2002.
- VAGO, A.R. *et al.* Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. **Am J Pathol**, v. 149, n. 6, p. 2153-2159, 1996.
- VAGO, A.R. *et al.* Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **Am J Pathol**, v. 156, n. 5, p. 1805, 2000.
- VERA-CRUZ, J. M. *et al.* Molecular diagnosis of Chagas' disease and use of an animal model to study parasite tropism. **Parasitology Research**, v. 89, n. 6, 2003.

WAGHABI, M. C. *et al.* SB-431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 8, p. 2905–2910, 2007.

WILKINSON, S. R. *et al.* Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione- dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 11, p. 8220–8225, 2000.

WILKINSON, S. R. *et al.* The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 19, p. 17062–17071, 2002a.

WILKINSON, S. R. *et al.* TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. **Biochemical Journal**, v. 364, p. 787–794, 2002b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; NEWS, O. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. [Http://www.who.int/wer](http://www.who.int/wer), v. 90, n. 6, p. 33–44, 2015.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Fact Sheet, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 03 jan. 2017.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis): What is Chagas disease?**. 2017a. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/disease/en/>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION. **Symptoms and diagnosis of Chagas disease**. 2017b. Disponível em: <http://www.who.int/chagas/home_symptoms/en/>. Acesso em: 15 jan. 2017.

WU, W. S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 4, p. 695-705, 2006.

YEO, M. *et al.* Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 225–233, 2005.

ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community. **Cell Calcium**, v. 50, n. 3, p. 211-221, 2011.

ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.

ZINGALES, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240-253, 2012.

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S. J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. **Physiological reviews**, v. 94, n. 3, p. 909–950, 2014.