

Rafael André Ferreira

Dissertação de Mestrado

Expressão de IL-15 durante a infecção por  
*Trypanosoma cruzi*

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Belo Horizonte – MG

2017

Rafael André Ferreira

Expressão de IL-15 durante a infecção por  
*Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira

Co-orientadora: Profa. Dra. Fabiana Simão Machado

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Belo Horizonte – MG

2017

Aos meus pais,  
José Carlos e Maria Aparecida,  
por todo amor, incentivo,  
apoio e torcida.

# Agradecimentos

---

Inicialmente agradeço a DEUS, pelo dom da vida e por ter me dado a oportunidade de conhecer pessoas tão especiais nessa brilhante jornada da ciência!

À minha orientadora Santuza e co-orientadora Fabiana, por toda a dedicação durante o mestrado, acendendo luzes no meu caminho, me contagiando com esse amor pela pesquisa e pela ciência. O seu dom de ensinar é tão pulsante que até emociona. Vocês não foram somente orientadora e co-orientadora, mas, em alguns momentos, conselheiras, confidentes, mães e amigas. Vocês são referências profissionais e pessoais para meu crescimento. Obrigado por me acompanharem e acreditarem tanto em mim!

A todos os colaboradores e ajudadores por participarem espontaneamente deste trabalho, em especial ao Paulo Gaio pela ajuda nas imunofluorescências. À Sarah Giarola e ao pesquisador Dr. Alexandre, pela ajuda nos ELISAs. Ao Diego Rodney e Anny Caroline pela ajuda imensurável e por me socorrerem sempre com os “tripos”. Ao Vitor Costa e ao Thiago Castro pelo constante socorro com as Leishmanias e diversas dúvidas. Ao Wesley Braga pelo apoio e ajuda nas quantificações das imunofluorescências.

Aos meus amigos e colegas do querido Laboratório de Genômica e Genética Molecular de Tripanosomatídeos – LGGMT.

A todos os alunos, professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, especialmente aos professores Erich B. Tahara e Patiu Horta por todas as boas conversas e aconselhamentos.

Aos professores do departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG Gregory Kitten, pelos grandes ensinamentos em imunohistoquímica e microscopia confocal e Gustavo Menezes, por abrir as portas do seu laboratório e disponibilizar seus microscópios para aquisição das tão valiosas imagens que estão contidas neste trabalho. Vocês também foram referenciais para mim!

Aos funcionários do Colegiado de Pós-graduação, especialmente ao Alexandre e Orlando, pela disponibilidade, simpatia e gentileza. Obrigado pela ajuda! Agradeço, também, à CAPES pelo apoio financeiro.

Às Professoras Flávia Carolina, Letícia Braga, Luciene França e Helen Lima, por acreditarem em meu potencial de uma forma que nem eu mesmo acreditava. Sempre disponíveis e solícitas.

À minha família, em especial aos meus pais, José Carlos e Maria Aparecida que sempre me deram apoio e acreditaram em minha capacidade, me achando sempre brilhante, mesmo, muitas vezes, eu não sendo. Isso só me motivou e me fez perseverar a sempre dar o melhor de mim. Obrigado pelo amor incondicional e sem limites! Ao Ricardo, por toda a ajuda, mensurável e imensurável. À pequena Lara, que, com sua ingenuidade, sempre me trouxe paz e serenidade e me fez, várias vezes, olhar o mundo na ótica das crianças: com esperança! Aos meus irmãos, Dassaieve e Murilo, e à minha cunhada Fernanda, minha gratidão, pois sempre se orgulharam de mim e confiaram em meu trabalho e em minha vocação. Obrigado por acreditar! A meus tios, tias, primos e primas, especialmente ao tio Ailton, tia Miralda (Dindinha) e tia Deí e tia Ester, que vibraram comigo e por mim, desde a graduação, e sempre fizeram “propaganda” positiva a meu respeito. Obrigado pela força!

Aos meus amigos de sempre, Bárbara, Nandinha e Sued, por só desejarem a minha felicidade e me valorizarem tanto como pessoa. Obrigado pela preciosa amizade! À Cláudia Isoni, por todo apoio e amizade. Ao Marcus Vinícius pela grande e preciosa amizade e pelo incentivo sempre.

Agradeço ao Juliano Leal (*in memoriam*) que foi fundamental para me ajudar a tornar real este sonho desde o dia em que me apresentou o Laboratório de Genômica e Genética Molecular de Tripanosomatídeos – LGGMT e à professora Santuza, abrindo o caminho desta brilhante oportunidade. Ao Elimar pela amizade.

Agradeço todos os demais que, de alguma forma, contribuíram com meu trabalho e cujos nomes não se encontram citados aqui. Saibam que, com vocês, eu aprendi muito mais do que técnicas, conceitos ou metodologias, aprendi um pouco mais do que é ser humano, do que é a vida. OBRIGADO A TODOS!

# I. Resumo

---

Ensaio de duplo híbrido de levedura forneceu evidências de que a interleucina 15 (IL-15), seria uma das proteínas da célula hospedeira com que as amastinas, proteínas presentes na superfície de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania spp*, poderiam interagir durante o seu desenvolvimento intracelular. Com o objetivo de validar os resultados do duplo híbrido e investigar o papel da IL-15 durante a infecção por *T. cruzi*, nós analisamos macrófagos peritoneais murinos infectados com *T. cruzi* e *L. amazonensis*, bem como células L6, LLCMK2 e H9C2 infectadas com *T. cruzi*, por meio de Elisa e ensaios de imunofluorescência. Utilizando a técnica de ELISA de captura, mostramos a indução da produção da proteína na sua isoforma citoplasmática nas células infectadas comparadas às células não infectadas. Por outro lado, os níveis da forma secretada foram indetectáveis em todos os ensaios de infecção, com exceção da infecção das células H9C2. Em macrófagos murinos infectados por *L. amazonensis*, IL-15 teve sua expressão diminuída nas horas iniciais da infecção, porém após 72 horas foi observado que os níveis de IL-15 intracelular chegavam a níveis próximos daqueles encontrados em macrófagos não infectados. Análises de imunofluorescência mostraram uma distribuição uniforme de IL-15 no citoplasma e no núcleo das células não-infectadas, ao contrário das células infectadas, nas quais foi observado um aumento da concentração de IL-15 no citoplasma. Não somente em macrófagos infectados por *T. cruzi* ou *L. amazonensis*, mas também em células L6 infectados com *T. cruzi*, foi observada uma polarização de IL-15 em regiões próximas aos amastigotas. Macrófagos murinos previamente estimulados com IL-15 recombinante tiveram sua ação tripanocida potencializada, sugerindo que IL-15 secretada e intracelular possuem diferentes papéis durante a infecção por *T. cruzi*. Macrófagos de camundongos nocautes para IL-15 infectados com *T. cruzi* apresentaram redução do número de amastigotas por célula infectada e redução na porcentagem de células infectadas quando comparados com os macrófagos de camundongos selvagens, corroborando ainda mais a hipótese do papel da IL-15 citoplasmática na viabilidade do estágio intracelular do parasito.

## II. Abstract

---

Yeast two-hybrid assays provide evidences indicating that interleukin 15 (IL-15) are among the host cell proteins with which *Trypanosoma cruzi* amastins interact during the parasite intracellular development. A role of IL-15 during *T. cruzi* and *Leishmania spp* infection have been also suggested from transcriptome analyses of human fibroblasts and mice macrophages infected with *T. cruzi* and *L. major*, respectively, which showed a significant increase in the IL-15 mRNA expression compared to uninfected cells. With the aim to validate the yeast two-hybrid (Y2H) result and to investigate the role of IL-15 during *T. cruzi* infection, we analysed murine peritoneal macrophages infected with *T. cruzi* and *L. amazonensis* as well as L6 myoblasts, LLCMK2 cells and H9C2 cells infected with *T. cruzi*, using ELISA and immunofluorescence assays. ELISA performed with proteins extracts showed increased levels of intracellular IL-15 in infected cells compared to uninfected fibroblast and macrophages. With the exception of the infection of H9C2 cells, the secreted form of IL-15 was undetectable. In murine macrophages infected by *L. amazonensis*, IL-15 showed decreased expression in the early hours of the infection. Immunofluorescence analyses showed a uniformed distribution of IL-15 in the cytoplasm and nuclei of uninfected macrophages whereas, in infected cells, IL-15 is predominantly localized in the cytoplasm. Importantly, not only in infected macrophages but also in L6 cells infected with *T. cruzi*, an interaction of IL-15 with the membrane of amastigotes was observed. A similar polarization of IL-15 next to parasitophorous vacuoles containing amastigotes was observed in macrophages infected with *L. amazonensis*. Murine macrophages previously stimulated with IL-15 recombinant have enhanced killing capacity of *T. cruzi* amastigotes, indicating that the roles of secreted IL-15 and the intracellular form of this cytokine may differ during the *T. cruzi* infection. When macrophages of mice IL-15<sup>-/-</sup> were infected by *T. cruzi*, a reduction in the number of amastigote per infected cells and reduction in the percentage of infected cells was observed when compared to the wild type macrophages, further suggesting a role of the cytoplasmic IL-15 in the viability of the intracellular stage of the parasite.

### III. Lista de figuras

---

Figura 1: Distribuição de casos da doença de Chagas no mundo.....	3
Figura 2: Principais sinais de porta de entrada para a doença de Chagas indicando contato entre o vetor e hospedeiro mamífero.....	5
Figura 3: Ciclo de vida do protozoário flagelado, <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	8
Figura 4: Visão geral do papel central dos macrófagos na resposta imune durante a infecção por <i>T. cruzi</i> .....	10
Figura 5: Árvore filogenética com as amastinas pertencentes às diferentes subfamílias nas diversas espécies de tripanosomatídeos.....	14
Figura 6: Ensaio de duplo híbrido para testar possíveis proteínas que poderiam interagir com as amastinas.....	18
Figura 7: Principais características da produção e função de IL-15.....	25
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando a genotipagem dos camundongos a serem utilizados nos experimentos de infecção.....	37
Figura 9: Porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por 100 células infectadas em macrófagos peritoneais murinos infectados com tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	43
Figura 10: ELISA de extrato celular de macrófagos peritoneais mostrando os níveis de IL-15 em resposta a infecção por <i>T. cruzi</i> .....	45
Figura 11.1: Localização de IL-15 citoplasmática de macrófagos murinos durante a infecção por <i>T. cruzi</i> . ....	46
Figura 11.2: Localização de IL-15 citoplasmática de macrófagos murinos durante a infecção por <i>T. cruzi</i> (com amplificação da imagem) .....	47
Figura 12: Controles da imunofluorescência em macrófagos peritoneais murinos infectados por <i>T. cruzi</i> , utilizando apenas a marcação com anticorpo secundário.....	48

Figura 13: Comparação do sinal de fluorescência (CTCF) para IL-15 intracelular entre macrófagos não infectados e infectados com <i>T. cruzi</i> .....	49
Figura 14: Porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por 100 células infectadas em macrófagos peritoneais murinos infectados com promastigotas metacíclicas de <i>Leishmania amazonensis</i> .....	51
Figura 15: ELISA de extrato celular de macrófagos peritoneais mostrando os níveis de IL-15 em resposta a infecção por <i>L. amazonensis</i> .....	53
Figura 16.1: Localização de IL-15 citoplasmática de macrófagos murinos durante a infecção por <i>Leishmania amazonensis</i> .....	55
Figura 16.2: Localização de IL-15 citoplasmática durante a infecção de macrófagos murinos por <i>Leishmania amazonensis</i> (com amplificação da imagem) .....	56
Figura 17: Controles da imunofluorescência de macrófagos peritoneais murinos infectados por <i>L. amazonensis</i> utilizando apenas a marcação com anticorpo secundário.....	57
Figura 18: Comparação do sinal de fluorescência (CTCF) para IL-15 intracelular entre macrófagos não infectados e infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	58
Figura 19: Porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por 100 células infectadas em células L6 infectadas com <i>T. cruzi</i> .....	60
Figura 20: Porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por 100 células infectadas em células LLCMK2 infectadas com <i>T. cruzi</i> .....	61
Figura 21: Porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por 100 células infectadas em células H9C2 infectadas com <i>T. cruzi</i> .....	62
Figura 22: ELISA do extrato celular de células L6 mostrando os níveis de IL-15 em resposta a infecção por <i>T. cruzi</i> .....	64
Figura 23: ELISA do extrato celular de células LLCMK2 mostrando os níveis de IL-15 em resposta a infecção por <i>T. cruzi</i> .....	65
Figura 24: ELISA do extrato celular de células H9C2 mostrando os níveis de IL-15 em resposta a infecção por <i>T. cruzi</i> .....	66

Figura 25: ELISA do sobrenadante de cultura de células H9C2 mostrando os níveis de IL-15 em resposta a infecção por <i>T. cruzi</i> .....	67
Figura 26.1: Localização de IL-15 citoplasmática durante a infecção de células L6 por <i>T. cruzi</i> .....	69
Figura 26.2: Localização de IL-15 citoplasmática durante a infecção de células L6 por <i>T. cruzi</i> (com amplificação da imagem).....	70
Figura 27: Controles da imunofluorescência de células L6 infectadas por <i>T. cruzi</i> utilizando apenas a marcação com anticorpo secundário.....	71
Figura 28: Comparação do sinal de fluorescência (CTCF) para IL-15 intracelular entre macrófagos não infectados e infectados com <i>T. cruzi</i> .....	72
Figura 29: Porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por 100 células infectadas em macrófagos murinos previamente estimulados com IL-15 infectados com <i>T. cruzi</i> .....	74
Figura 30: Produção de óxido nítrico por macrófagos murinos previamente estimulados com IL-15 infectados com <i>T. cruzi</i> .....	76
Figura 31: Porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por 100 células infectadas em macrófagos murinos nocautes para IL-15 infectados com <i>T. cruzi</i> .....	78
Figura 32: Interação de IL-15 citoplasmática com os amastigotas de <i>T. cruzi</i> e <i>L. amazonensis</i> .....	88
Figura 33: Hipótese da interação de IL-15 intracelular com as amastinas presentes na superfície dos amastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	95

## IV. Lista de tabelas

---

Tabela 1: Informações sobre as linhagens celulares utilizadas neste trabalho.....31

# V. Abreviaturas

---

CCC	Chagas Cardiomiopática Crônica
CD	do inglês, <i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
CTCF	Fluorescência Total Celular Corrigida
DAPI	do inglês, <i>Diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM	do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Ensaio Enzimático Associado à Imunoadsorção
G-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos
GFP	do inglês, <i>Green Fluorescent Protein</i>
GM-CSF	Fator estimulador de Colônia de Granulócitos/ Macrófagos
GPIs	Glicoinositolfosfatidilipídeos
GST	Glutathione-S-Transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IFN- $\alpha$	Interferon-Alfa
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina de cadeia gamma
IgM	Imunoglobulina de cadeia mi ( $\mu$ )
JAK	Janus quinase
kb	kilobases
kDa	kilodaltons

LSP	do inglês, <i>Long Signal Peptide</i>
MHC	Principal Complexo de Histocompatibilidade
mM	Milimolar
mRNAs	RNA mensageiro
ng	Nanogramas
NK	do inglês, <i>Natural Killer</i>
nt	nucleotídeos
ORF	do inglês, <i>open reading frame</i>
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS-T	Salina Tamponada com Fosfato e Tween
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PKA	Proteína quinase A
PMSF	do inglês, <i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
SSP	do inglês, <i>Short Signal Peptide</i>
STAT	proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição
TMB	Tetrametilbenzidina
UTR	do inglês, <i>untranslated region</i>
VL	Leishmaniose Visceral
WT	do inglês, <i>Wild Type</i>

# Índice

---

1. Introdução.....	1
1.1 A doença de Chagas e seu agente causador, <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	1
1.2 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	6
1.3 Resposta imune durante a infecção por <i>T. cruzi</i> .....	9
1.4 Proteínas envolvidas na interação parasito-hospedeiro: as amastinas.....	11
1.5 Estudo sobre a função das amastinas em <i>T. cruzi</i> e em <i>Leishmania spp.</i> .....	15
1.6 Interleucina 15 (IL-15): uma citocina pleiotrópica da resposta inflamatória.....	21
2. Objetivos.....	28
2.1. Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3. Material e métodos.....	29
3.1 Obtenção de macrófagos intraperitoneais.....	29
3.2 Infecção de macrófagos peritoneais murinos com as formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa Y e promastigotas metacíclicas de <i>Leishmania amazonensis</i> .....	29
3.3 Cultivo das linhagens celulares LLCMK2, L6 e H9C2.....	30
3.4 Cultivo das formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	32
3.5 Infecção de células LLCMK2, L6 e H9C2 com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa Y.....	32
3.6 Obtenção das formas promastigotas metacíclicas de <i>Leishmania amazonensis</i> .....	33

3.7 Animais.....	34
3.8 Obtenção das amostras da cauda de camundongo para genotipagem.....	34
3.9 Extração de DNA pelo protocolo de fenol/clorofórmio.....	34
3.10 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	35
3.11 Índices de infecção.....	38
3.12 Medição da produção óxido nítrico (NO).....	38
3.13 ELISA.....	39
3.14 Imunofluorescência por microscopia confocal para detecção de IL-15.....	40
3.15 Comparação do sinal da fluorescência pelo cálculo da Fluorescência Total Celular Corrigida (CTCF).....	41
3.16 Infecção de células previamente estimuladas com IL-15 recombinante....	41
3.17 Análises estatísticas.....	41
4. Resultados.....	42
4.1 Detecção de IL-15 no sobrenadante e em extrato celular de macrófagos infectados com <i>T. cruzi</i> .....	42
4.2 Imunolocalização de IL-15 em macrófagos murinos infectados por <i>T. cruzi</i> .....	45
4.3 Detecção de IL-15 em sobrenadante e extrato celular de macrófagos durante a infecção por <i>Leishmania amazonensis</i> .....	50
4.4 Imunolocalização de IL-15 em macrófagos murinos infectados por <i>Leishmania amazonensis</i> .....	54

4.5 Detecção de IL-15 em sobrenadante e extrato celular de cultura de células L6, LLCMK2 e H9C2 infectadas com <i>T. cruzi</i> .....	59
4.6 Imunolocalização de IL-15 em células L6 infectadas por <i>T. cruzi</i> .....	68
4.7 Infecção de macrófagos peritoneais murinos previamente estimulados com IL-15 com tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	73
4.8 Infecção de macrófagos peritoneais murinos nocautes para IL-15 com tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	77
5. Discussão.....	79
6. Perspectivas.....	96
7. Referências bibliográficas.....	98

# 1. Introdução

---

## 1.1 A doença de Chagas e seu agente causador, *Trypanosoma cruzi*

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae é o agente etiológico da doença de Chagas. Foi primeiramente identificado por Carlos Chagas em 1909, que também descreveu seu ciclo de vida, o hospedeiro invertebrado transmissor do parasito, os hospedeiros vertebrados reservatórios e sinais e sintomas da doença (Chagas, 1909; Brener, 1973).

Como mostrado na figura 1, a América Latina é a região de maior endemia para esta doença. Porém, devido às intensas migrações, sua incidência vem aumentando também nos Estados Unidos, países da Europa e alguns países do pacífico ocidental. Atualmente estima-se que cerca de 6-8 milhões de pessoas estão infectadas pelo parasito em todo o mundo (WHO, 2015). Devido às políticas de controle de vetores iniciadas na década de 1970, o Brasil recebeu, em 2006, a Certificação Internacional pela Interrupção da Transmissão de doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*. Por outro lado, é estimado que cerca de 25 por cento da população da América Latina viva em regiões endêmicas para a doença. Assim, países como a Bolívia, por exemplo, apresentaram sérias falhas em suas políticas de erradicação da infecção pelo *T. cruzi* (Massad, 2008; Schmunis, 2007; Centers for Disease Control and Prevention, 2016; Ministério da Saúde - Brasil, 2017, disponível em <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas>).

A transmissão ocorre principalmente através das fezes e urina de insetos hematófagos infectados, pertencentes a família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*. Ao todo são 130 espécies de insetos triatomíneos identificadas, porém três delas são as mais importantes na transmissão do parasito para o homem: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* (Brener, 1973). As áreas rurais e semi-urbanas são os locais de maior probabilidade de encontrar este tipo de inseto. O inseto triatomíneo possui hábitos noturnos, horário em que realiza o repasto sanguíneo. Formas menos comuns de infecção compreendem transfusão sanguínea (Young *et al.*, 2007), transplante de órgãos, transmissão vertical (Gürtler *et al.*, 2003) e por ingestão de comida ou bebida contaminada com o parasito. Neste último caso, a transmissão para o hospedeiro humano eventualmente ocorre em arredores de

fazendas e plantações (geralmente cana-de-açúcar ou plantações de açaí) onde os parasitos são introduzidos por defecação ou por inoculação direta, a partir de insetos triatomíneos infectados, no caule da planta-alvo, que penetram e se alojam na polpa. Não obstante, o inseto foi encontrado em torno da casca da cana de açúcar, tornando-se praticamente invisível. Quando uma planta infectada é processada e eventualmente consumida sob a forma de polpa, uma enorme quantidade de parasitos é transportada para o trato gastrointestinal do indivíduo pela quebra da barreira epitelial por penetração direta ou através de pequenas lesões imperceptíveis. Apesar de a transmissão oral não ter sido originalmente descrito por Carlos Chagas, atualmente já se sabe que o parasito tem um período médio de incubação de cinco dias. Este modo particular de transmissão tem alta taxa de mortalidade e um quadro clínico mais severo em idades mais jovens. (Benchimol *et al.*, 2006; Stuart *et al.*, 2008).

### Distribuição de casos de infecção por *Trypanosoma cruzi* (2006-2009)

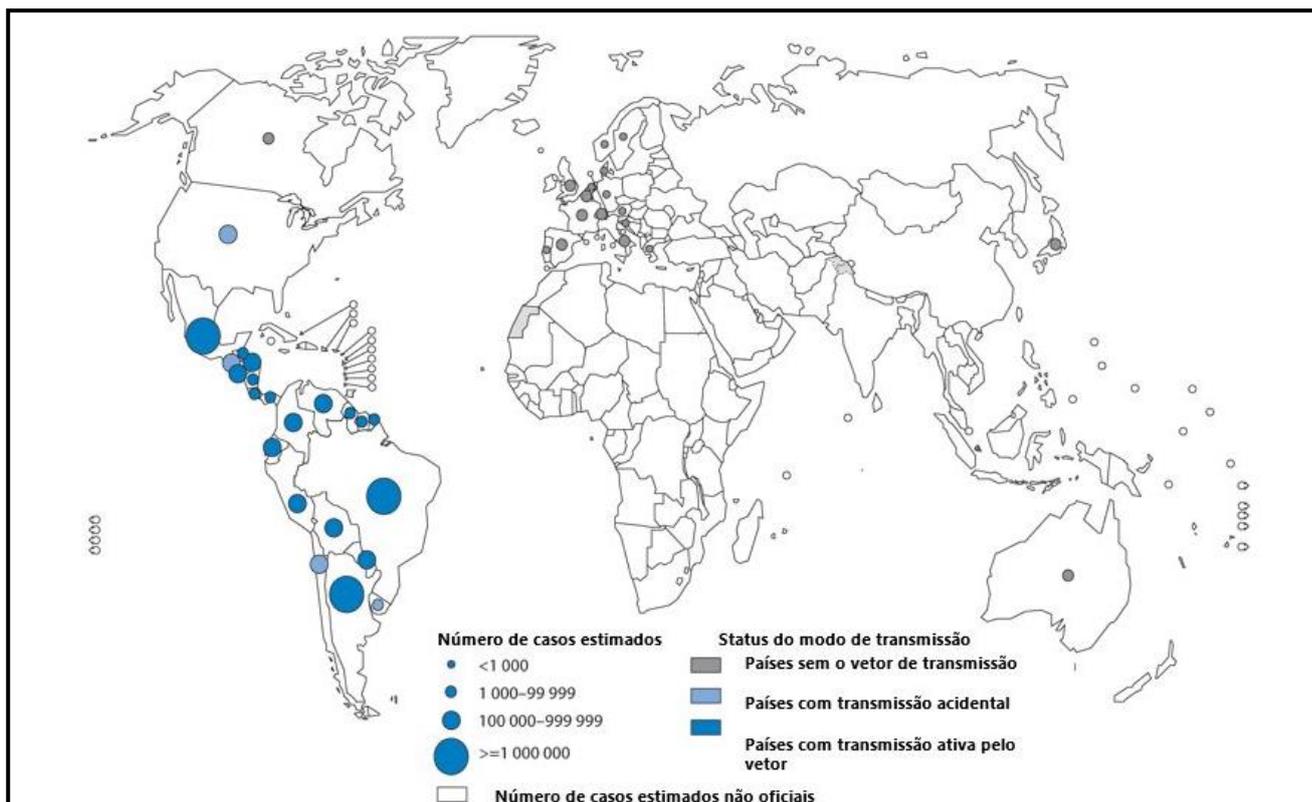


Figura 1: **Distribuição de casos da doença de Chagas no mundo.** A América Latina é a região de maior endemia para esta doença. Os casos da doença humana se predominam no hemisfério ocidental, com ampla distribuição em zonas rurais do México, da América Central e América do Sul. Porém, devido ao intenso fluxo migratório, atualmente já se registram casos nos Estados Unidos, Canadá e regiões da Europa e Ásia (Adaptado de WHO, 2015).

Os insetos hematófagos infectados picam a pele em áreas expostas, defecando no local da picada. Ao coçar o local da picada, o indivíduo provoca o espalhamento dos parasitos, que acabam penetrando no organismo por meio da lesão que a picada do inseto provocou. A lesão provocada pela picada pode resultar no surgimento dos chamados sinais de porta de entrada que são o chagoma na região da pele ou o sinal de Romana, na região da mucosa ocular (Figura 2).

A fase aguda da doença de Chagas se inicia aproximadamente 3 semanas após o início da infecção. Nesse período se pode observar altos níveis de parasitemia a parasitismo. Os sintomas mais típicos neste período são: febre, dor de cabeça, aumento do tamanho dos linfonodos, palidez, fraqueza muscular generalizada, falta de ar e cansaço, surgimento de edema generalizado, dor abdominal ou no peito (Brener *et al.*, 2000; Cançado, 1999; Junqueira *et al.*, 2010).

O início da fase crônica da doença se dá à medida em que se observa o decaimento dos níveis de anticorpos contra *T. cruzi* tipo IgM no soro de pacientes infectados com o conseqüente aumento dos níveis de IgG. A partir de então, a resposta imune atua por controlar a parasitemia e o parasitismo tecidual. Aproximadamente 60-70% dos portadores da doença de Chagas não vivem a manifestação de sinais clínicos da doença na fase crônica, apesar de possuírem anticorpos contra o parasito. Essa característica da doença é típica da fase indeterminada (Brener *et al.*, 2000).

**A****B**

Figura 2: **Principais sinais de porta de entrada para a doença de Chagas indicando contato entre o vetor e hospedeiro mamífero.** Devido aos seus hábitos noturnos, o barbeiro geralmente realiza o repasto sanguíneo quando o indivíduo está dormido, lesionando as partes mais expostas do corpo. As áreas mais frequentemente lesionadas são as mucosas nos olhos, dando origem ao sinal Romaña (A) e em outras regiões da pele, originando o chagoma (B) (Instituto de Salud del Estado de México, 2017).

Aproximadamente 30% dos indivíduos em fase crônica acabam desenvolvendo algum tipo de anomalia cardíaca, digestiva ou até mesmo neurológica em decorrência das complicações e evolução da doença. Essas anomalias são caracterizadas por cardiomiopatia inflamatória com fibrose do tecido cardíaco, evoluindo para insuficiência cardíaca, comprometimento do sistema mesentérico, causando severo desequilíbrio do sistema peristáltico no esôfago e cólon. Em casos mais graves há o surgimento dos megacólon e megaesôfago (Junqueira *et al.*, 2010; Tarleton *et al.*, 2007).

Contudo, a despeito dos grandes avanços nas pesquisas sobre o *T. cruzi*, ainda não existem vacinas eficazes que possam combater a doença. Assim a melhor forma de prevenção é o combate ao vetor. Atualmente, existem dois medicamentos para o tratamento da doença, o benzonidazol e o nifurtimox. Porém, além de serem eficazes apenas na fase aguda, período em que raramente o indivíduo será diagnosticado com a doença, eles apresentam severos efeitos colaterais e são contra-indicados em pacientes grávidas ou aqueles portadores de doenças hepáticas ou renais (Tarleton *et al.*, 2007).

## **1.2 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi***

*T. cruzi* possui três formas de vida durante todo o seu ciclo que se alternam entre o hospedeiro invertebrado e vertebrado: amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas. As formas epimastigotas e amastigotas são consideradas replicativas, porém apenas a forma amastigota se replica na célula hospedeira do mamífero (Brener, 1973).

Quando o inseto vetor realiza o repasto sanguíneo em mamíferos infectados por *T. cruzi*, ele acaba ingerindo as formas tripomastigotas presentes na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero. Esses parasitos migram para o estômago do inseto. Nesse local, ocorre a lise de muitos parasitos, porém uma pequena parcela de parasitos sobrevive por conseguir se diferenciar na forma epimastigota (Castro *et al.*, 2007).

No intestino do hospedeiro vetor, ocorrem sucessivos processos de divisão binária. Assim, os parasitos migram para a porção posterior do intestino, chegando

até o reto. Há um intenso processo de adesão desses parasitos às membranas das perimicrovilosidades das células intestinais (Alves *et al.*, 2007), que envolve a participação de glicoconjugados e proteínas presentes nestas vilosidades como por exemplo, glicoinositolfosfatidilipídeos (GPIs), induzindo a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigota metacíclicas, que são infectivas para a espécie mamífera (Alves *et al.*, 2007; Nogueira *et al.*, 2007). Esses parasitos, por sua vez, são liberados junto com a fezes e urina do inseto durante o repasto sanguíneo, ocorrendo assim, a infecção no mamífero (Garcia *et al.*, 2007).

Tripomastigotas de *T. cruzi* podem infectar qualquer célula nucleada. No interior destas células há a diferenciação dos tripomastigotas em amastigotas, que são as formas replicativas neste caso. Após vários estágios de replicação por modo binário, esses parasitos se diferenciam em tripomastigotas capazes de romper a membrana das células. Assim, eles tomam a corrente sanguínea, infectam outras células e podem ser ingeridos, novamente, por insetos triatomíneos hematófagos no momento do repasto sanguíneo [(Brener *et al.*, 2000; Junqueira *et al.*, 2010; Buscaglia *et al.*, 2006; para uma revisão leia Souza W. *et al.*, (2010)]. O ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* pode ser observado na figura 3.

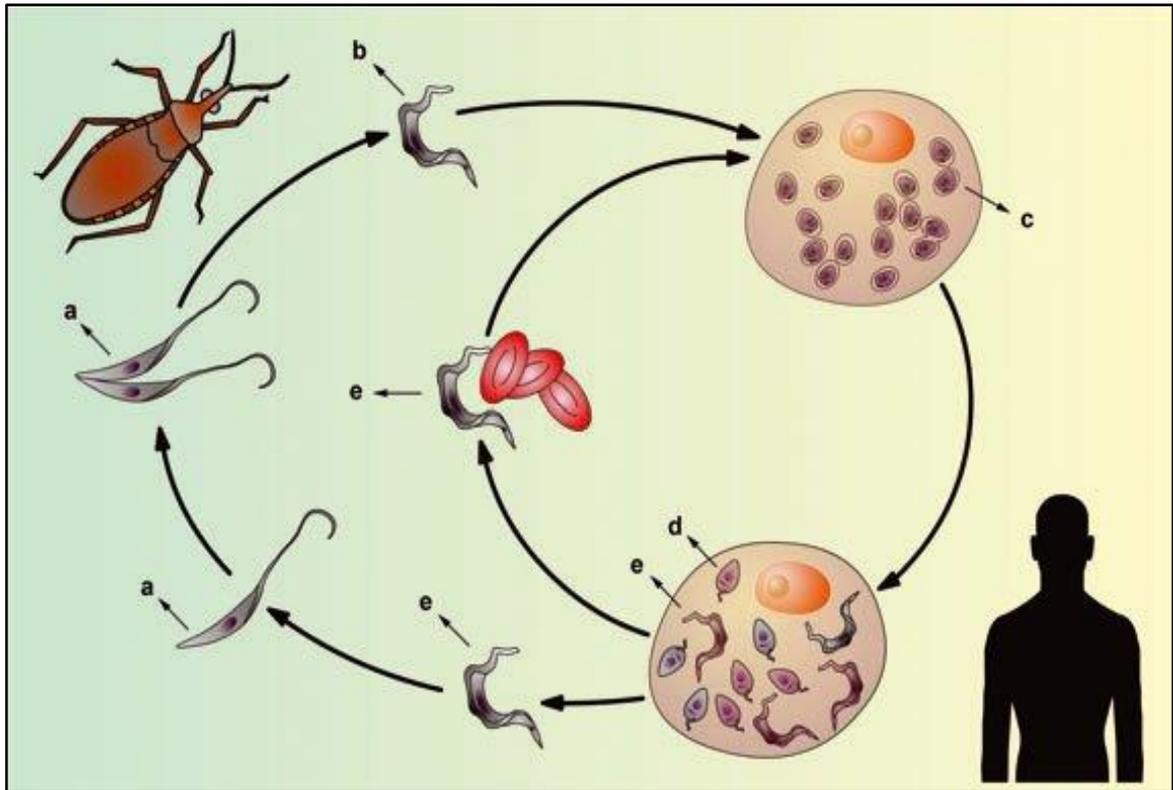


Figura 3: **Ciclo de vida do protozoário flagelado, *Trypanosoma cruzi*.** (A) Forma replicativa não infecciosa epimastigota, encontrada predominantemente do intestino dos insetos hematófagos que origina a forma não replicativa tripomastigota metacíclica altamente infecciosa (B). As formas metacíclicas tem capacidade de invadir as células nucleadas e se diferenciar na forma replicativa amastigota. Posteriormente, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas (D, E). Os tripomastigotas podem disseminar no hospedeiro mamífero através da corrente sanguínea e, eventualmente serem ingeridos pelo inseto hematófago no momento do repasto sanguíneo. O ciclo chega ao fim no momento em que os tripomastigotas ingeridos se diferenciam em epimastigotas (A), que são as formas que colonizam o tubo digestivo de um novo inseto (Boscardin *et al.*, 2010).

### 1.3 Resposta imune durante a infecção por *T. cruzi*

De modo geral a infecção por *Trypanosoma cruzi* provoca uma série de reações no sistema imune do hospedeiro, que proporcionam uma potente resposta celular, visando o controle da disseminação e multiplicação do parasito. Do mesmo modo que ocorre na maioria das infecções por patógenos intracelulares, o *T. cruzi* induz diversos mecanismos do sistema imune, provocando a ativação de mediadores inflamatórios. Assim, há um intenso combate por parte do organismo hospedeiro mamífero para que a proliferação dos parasitos seja eliminada. Esse conjunto de resposta do sistema imune associada a persistência indefinida do parasito, acaba gerando uma série de lesões teciduais que, por sua vez, induz a comprometimentos funcionais, principalmente, nos tecidos musculares e nervosos, que são tipicamente acometidos durante doença de Chagas (Cuervo *et al.*, 2011).

Como pode ser observado na figura 4, a ativação das células *Natural Killer* (NK), com conseqüente secreção de IFN- $\gamma$ , estimula macrófagos a produzirem óxido nítrico, pela indução da expressão da enzima óxido nítrico sintase (Scott e Trinchieri, 1995; Muñoz-Fernandez *et al.*, 1992). Macrófagos ativados também são responsáveis pela produção de IL-12, e TNF- $\alpha$  que, também, estimula células NK a produzirem IFN- $\gamma$  (Aliberti *et al.*, 1996; Gazzinelli *et al.*, 1992; Santos-Lima & Minoprio, 1997). Outras citocinas como IL-17, IL-10 e TGF- $\beta$  parecem agir como papel regulatório no decorrer da infecção. Estas duas últimas são produzidas por macrófagos e exibem um importante papel na infecção por *T. cruzi*, inibindo, *in vitro*, a produção de NO e a atividade tripanocida de macrófagos infectados e ativados por IFN- $\gamma$  (Gazzinelli *et al.*, 1992; Roffê *et al.*, 2012; Miyazaki *et al.*, 2010).

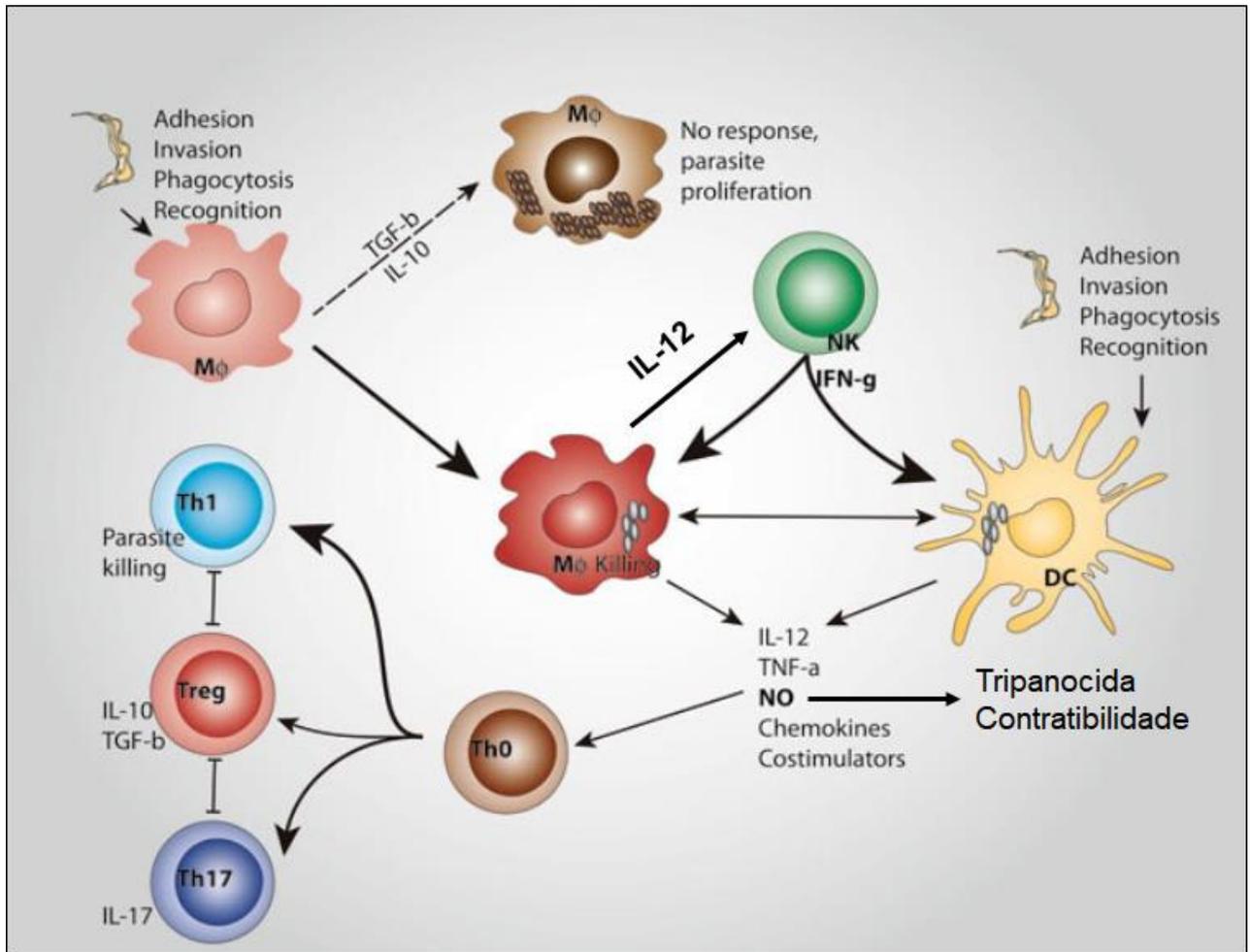


Figura 4: **Visão geral do papel central dos macrófagos na resposta imune durante a infecção por *T. cruzi*.** De modo geral, a morte do parasita por macrófagos exige a presença de IFN-gama, produzida principalmente por NK e células teciduais. Após a detecção de *T. cruzi*, macrófagos são estimulados a produzir citocinas (principalmente TNF-alfa, IL-12), mediadores inflamatórios tais como NO, bem como várias quimiocinas. Esses mediadores são capazes de induzir a migração e ativação de células inflamatórias para o local da infecção, que incluem monócitos, células NK e linfócitos T. Na presença de células apresentadoras de antígenos profissionais ativadas como células dendríticas, os linfócitos T recrutados serão principalmente conduzidos à diferenciação em Th1, Th17 e/ou Treg. Algumas quimiocinas e IL-12 induzem células NK e linfócitos T a produzirem IFN-gama, resultando na ativação de macrófagos. Outras citocinas tais como IL-10 e TGF-beta também são produzidos e regulam a ativação de macrófagos e o todo resposta inflamatória local, que é estratégica para a proliferação do parasita (Adaptado de Gutierrez, 2011).

#### 1.4 Proteínas envolvidas na interação parasito-hospedeiro: as amastinas

As formas epimastigotas de *T. cruzi* são as formas mais estudadas devido à facilidade de cultivo em laboratório (Brenner & Chiari, 1965). Porém, estudos que envolvem a forma amastigota apresentam maior relevância para melhor compreender a doença devido ao fato de que esta forma replicativa mantém constante contato com as proteínas intracelulares do hospedeiro e, desta forma, induzir a produção de uma forte resposta imune contra os seus antígenos (Andrews *et al.*, 1987; Behbehani, 1973; Pan, 1978; Carvalho *et al.*, 1986; Lima *et al.*, 1988; Low *et al.*, 1998; Matsumoto *et al.*, 1993). Assim, estudar as proteínas de superfície da forma amastigota seria muito importante para a compreensão da interação parasito-hospedeiro e como se dá a progressão clínica da doença de Chagas. A identificação destas proteínas, poderia contribuir para esclarecer os mecanismos que influenciam nesta interação, mostrando alvos para a formulação de vacinas e elaboração de novos medicamentos (DaRocha *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2010; Sibley, 2011).

Ao analisar genes diferencialmente expressos em uma biblioteca de cDNA das formas amastigotas de *T. cruzi*, Teixeira e colaboradores (1994) identificaram uma nova família de glicoproteínas estreitamente relacionadas, as quais foram denominadas amastinas, pois foram encontradas na superfície da forma amastigota de *T. cruzi*. Esses autores identificaram esta família gênica específica de amastigota por meio de um *screening* diferencial de uma biblioteca de cDNA de amastigotas com sondas feitas a partir de mRNA das formas amastigotas e de epimastigotas. A família multigênica das amastinas possui 12 cópias no genoma do clone CL Brenner de *T. cruzi* e os genes são compostos por uma pequena região não traduzida 5' UTR, seguida de uma sequência de leitura aberta (ORF) de aproximadamente 522 pb e uma região não traduzida 3' UTR de 630 pb (Kangussu-Marcolino *et al.*, 2013). Os mRNAs de amastinas codificam proteínas de aproximadamente 174 aminoácidos que contém vários sítios potenciais de O-glicosilação. Os mRNAs das amastinas possuem aproximadamente 1,4 kb e são cerca de 50 vezes mais abundantes em amastigotas do que em epimastigotas ou tripomastigotas. Outro ponto importante desse estudo foi a observação de que os genes das amastinas eram transcritos de forma semelhante em amastigotas e epimastigotas, indicando que o controle dos níveis de mRNA das amastinas nos diferentes estágios sofria a ação de mecanismos pós-transcricionais.

As cadeias polipeptídicas das amastinas nascentes contêm quatro regiões hidrofóbicas com 20 a 30 aminoácidos cada, sendo duas dessas regiões nas extremidades N e C terminais (Teixeira *et al.*, 1994). Os genes das amastinas alternam com genes que codificam outra proteína, chamada tuzina, cujo mRNA de 1,7 kb é muito menos abundante em amastigotas. Experimentos que envolveram a exposição de amastigotas, a cicloheximida, substância que interfere na síntese protéica, mostraram uma diminuição de 3 vezes no mRNA de amastina, ao contrário dos níveis do mRNA de tuzina, que aumentou em torno de 7 vezes, mostrando que a regulação da expressão desses genes alternados é regulada por diferentes mecanismos, apesar dos genes das amastinas e tuzinas estarem organizados em *clusters* no genoma e serem transcritos em um único pré-mRNA policistrônico. Quando a região não traduzida 3' UTR das amastinas mais sua região intergênica foram fusionadas à região codificadora do gene da luciferase, a atividade de luciferase aumentou 7 vezes em amastigotas e diminuiu 5 vezes em epimastigotas, mostrando que a regulação da expressão desses genes, relacionada com os estágios de desenvolvimento do parasito, é dependente de sinais regulatórios presentes nessa região (Teixeira *et al.*, 1995). Foi demonstrado, também, que meia-vida do mRNA da amastina é 7 vezes maior em amastigotas do que em epimastigotas, e que uma sequência específica conservada na região não traduzida 3' UTR de todos os genes das amastinas é responsável pela regulação positiva de seus mRNAs, conferindo-lhes maior estabilidade. Essa região poderia servir como sítio de ligação para proteínas regulatórias que, uma vez estando mais abundante em amastigotas do que em epimastigotas, promoveriam o aumento da duração destes mRNAs (Coughlin *et al.*, 2000).

Wu e colaboradores (2000) demonstraram que, além de *T. cruzi*, ortólogos de genes das amastinas também estão presentes em várias espécies do gênero *Leishmania*. Usando uma metodologia semelhante àquela utilizada por Teixeira e colaboradores (1994), esse grupo indentificou uma nova família gênica com expressão aumentada nas formas amastigotas de *Leishmania donovani*. Essa família multigênica codificava uma proteína altamente hidrofóbica com identidade de 36% com as amastinas de *T. cruzi*.

A partir do sequenciamento dos genomas do *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005), *L. major* (Ivens *et al.*, 2005), *L. infantum* e da *L. braziliensis* (Peacock *et al.*, 2007) foi

possível verificar o número exato de genes de amastinas. Ao todo, foram identificados 24 homólogos de amastina em *L. major* e pelo menos 35 homólogos em *L. infantum*. Dos 24 homólogos em *L. major*, 14 possuem ortólogos em *L. infantum* como sugerido por estudos de comparação de sequências e análises filogenéticas. Por outro lado, nas espécies relacionadas ao gênero *Trypanosoma*, essa família é restrita a apenas 2 membros em *T. brucei* e 11 membros em *T. cruzi*. Todos os membros da família de genes de amastinas nas espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma* compartilham uma organização estrutural similar e contêm um domínio extracelular de 11 aminoácidos altamente conservado, que é exclusivo das amastinas. A maioria dos homólogos de genes de amastinas é especificamente expressa no estágio amastigota do parasita. Como em *T. cruzi*, alguns genes das amastinas de *Leishmania spp* também são intercaladas por genes de tuzinas. De modo similar ao *T. cruzi* as amastinas de *Leishmania spp* possuem quatro hélices compostas por aminoácidos hidrofóbicos, intercaladas por domínios que apresentam aminoácidos hidrofílicos com grande variabilidade entre os diferentes membros de amastinas (Rochette *et al.*, 2005).

Jackson (2010) estudou a evolução da família gênica das amastinas de diferentes representantes da família Trypanosomatidae, dividindo a família gênica das amastinas em 4 grupos,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  amastinas. Para essa divisão ele levou em consideração a posição genômica, estrutura da proteína e filogenia. Assim, os genes da  $\alpha$  amastinas existem nos tripanosomatídeos como um par *in tandem* enquanto que as  $\beta$  amastinas existem em *clusters* de genes *in tandem*. Os genes das  $\gamma$  amastinas são conservadas no gênero *Leishmania*, mas não no gênero *Trypanosoma* e existem como um arranjo gênico de múltiplas cópias *in tandem*. Os genes das  $\delta$  amastinas são altamente diversos, com loci espalhados em vários cromossomos no gênero *Leishmania*. Somente os genes das  $\delta$  amastinas são intercalados pelos genes de tuzinas. Como mostra a figura 5, Jackson (2010) elaborou uma árvore filogenética mostrando que em *T. cruzi* existem somente membros pertencentes às famílias das  $\beta$  e  $\delta$  amastinas, sendo que a sub-família das  $\delta$  amastinas sofreu expansão no gênero *Leishmania*.

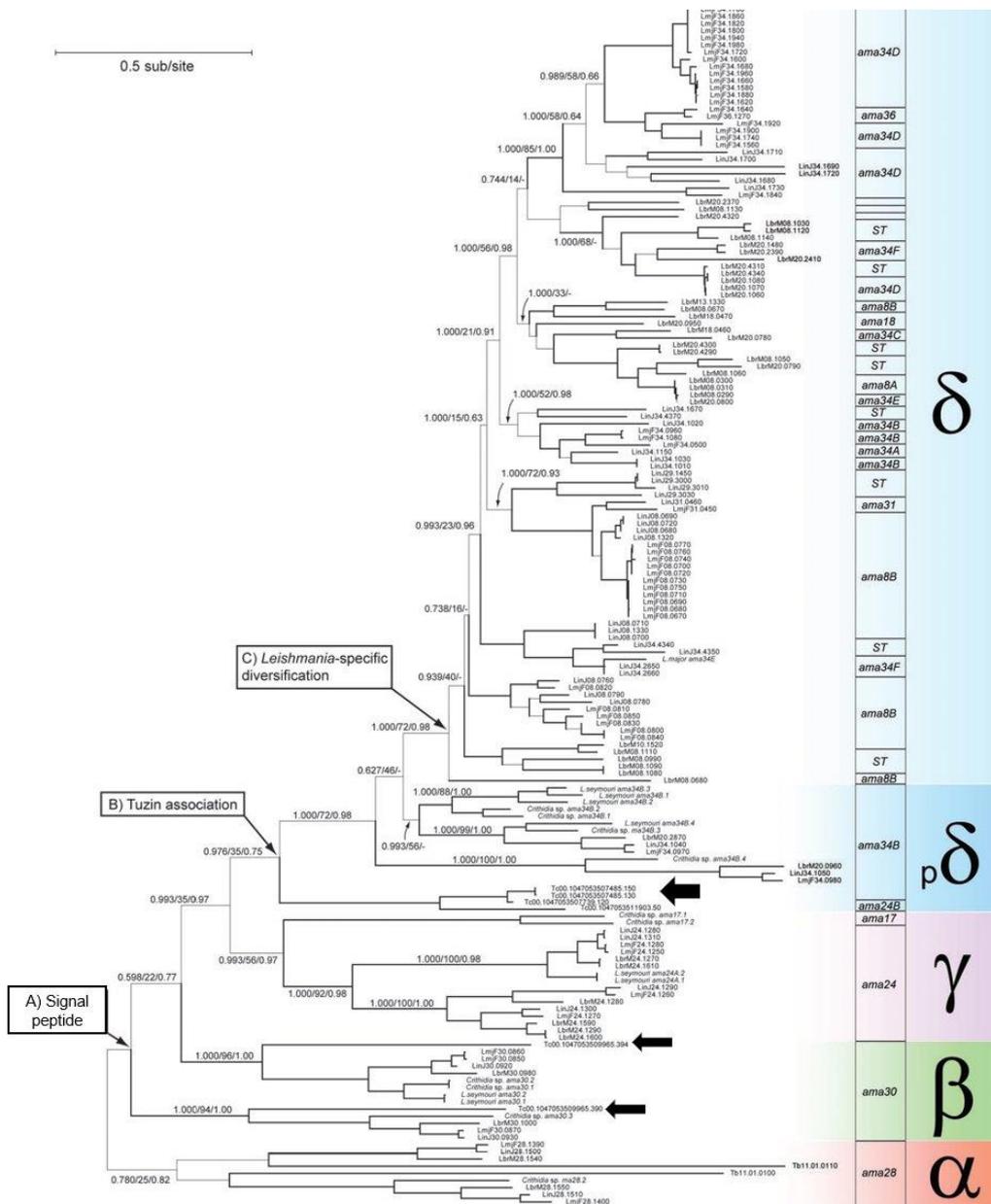


Figura 5: Árvore filogenética com as amastinas pertencentes às diferentes subfamílias nas diversas espécies de tripanosomatídeos. O identificador de cada amastina é mostrado em cada ramo da árvore. As diferentes subfamílias estão representadas à direita. As amastinas encontradas em *Trypanosoma cruzi* estão sinalizadas por setas. Os eventos evolutivos representados pelos nodos das árvores estão identificados pelas letras A: aquisição de peptídeos sinal; B: associação dos genes das amastinas com genes de tuzinas; e C: diversificações das  $\delta$  amastinas em *Leishmania spp* (Adaptado de Jackson, 2010).

## 1.5 Estudo sobre a função das amastinas em *T. cruzi* e em *Leishmania spp*

Cruz e colaboradores (2012) utilizaram a cepa G de *T. cruzi* para testar o papel destas  $\delta$ -amastinas, transfectando esses parasitos com as  $\delta$ -amastinas fusionadas com a proteína GFP. Os parasitos na forma epimastigota transfectados apresentaram altos níveis de metaciclogênese. Amastigotas intracelulares super-expressando as  $\delta$ -amastinas apresentaram uma rápida e eficiente transformação em tripomastigota de cultura com altos níveis de liberação desta forma no sobrenatante de células HeLa infectadas quando comparados com os valores apresentados pelos parasitos que não estavam super-expressando as  $\delta$ -amastinas. Experimentos de infecção *in vivo* mostraram o aparecimento precoce e em altos níveis de ninhos de amastigotas em tecido de fígado de camundongos infectados com parasitos super-expressando as  $\delta$ -amastinas, quando comparados com a infecção com parasitos WT, mostrando assim, um possível papel das amastinas no processo de diferenciação do parasito durante a infecção por *T. cruzi*, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Buscando entender sobre papel das amastinas em *T. cruzi*, Kangussu-Marcolino e colaboradores (2013) avaliaram a expressão das  $\beta$  e  $\delta$  amastinas em diferentes cepas de *T. cruzi*, observando que as  $\delta$ -amastinas tinham sua expressão aumentada na forma amastigotas de várias cepas de *T. cruzi*, exceto na cepa G, que é conhecida por ter pouca capacidade de infecção. Em contraste com o que foi observado em todas as cepas analisadas para  $\delta$ -amastinas, os transcritos de  $\beta$ -amastina eram mais abundantes em epimastigotas, o estágio encontrado no inseto vetor.

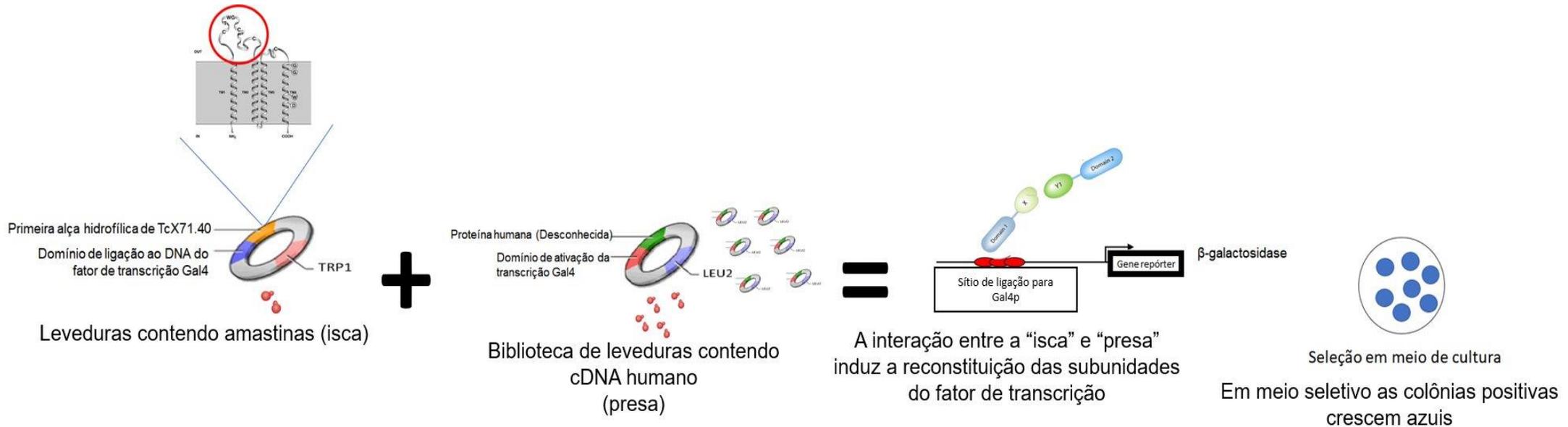
Uma das melhores técnicas para se estudar a função de determinada proteína é através do nocaute do gene. Porém, a obtenção de linhagens nocautes para todos os genes das amastinas por recombinação homóloga não é possível dado o número elevado de cópias deste gene no genoma de *T. cruzi*. Também não seria possível realizar o silenciamento destes genes por RNA de interferência, pois como descrito por DaRocha e colaboradores (2004), *T. cruzi* não possui uma maquinaria funcional de RNA de interferência. Sabendo destas limitações para se estudar a função das amastinas em *T. cruzi*, Paiva e colaboradores (2015) estudaram o papel das amastinas em *Leishmania braziliensis*. Foi observado neste trabalho que ao contrário de *T. cruzi*, *Leishmania* possuía a expressão aumentada de todos os representantes

das famílias das amastinas na forma amastigota. Parasitos que tiveram as  $\delta$ -amastinas silenciadas por RNAi apresentaram um menor índice de replicação em macrófagos quando comparados com os parasitos WT. Além disso, foi observado uma redução da interação da membrana destes parasitos com a membrana do vacúolo parasitóforo. Outro dado importante deste estudo, camundongos infectados na pata com os parasitos que haviam tido as  $\delta$ -amastinas silenciadas por RNAi não apresentaram parasitos em nenhum dos tempos avaliados quando comparados com aqueles que haviam sido infectados por *Leishmanias* WT ou expressando GFP.

Com o objetivo de aprofundar o conhecimento sobre a função das amastinas, o nosso grupo utilizou o ensaio do duplo híbrido em leveduras geneticamente modificadas para identificar proteínas da célula hospedeira que poderiam interagir com as amastinas presentes na superfície das amastigotas de *T. cruzi*. Para isso, parte da região codificadora que corresponde a alça hidrofílica de tamanho maior da amastina foi fusionada com a região codificadora do domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição da levedura Gal4 (Gal4DB) de *Saccharomyces cerevisiae*, e usado como isca no experimento de duplo híbrido. Para o *screening* de possíveis alvos foi testada uma biblioteca de mais de 15 mil cDNAs humanos fusionados com a região codificadora do domínio de ativação da transcrição do fator de transcrição Gal4 (*Pretransformed Normalized Matchmaker™ Human HeLa S3 Library*, Clontech). Havendo a interação da isca com alguma das proteínas humanas, ocorreria, também, a reconstituição das subunidades do fator de transcrição e conseqüentemente a sua função, permitindo, assim, a transcrição de um gene repórter, que nesse caso, foi o gene da  $\beta$ -galactosidase. Em todos os clones nos quais o fator de transcrição foi reconstituído, houve expressão de  $\beta$ -galactosidase, gerando colônias azuis em meio seletivo, contendo X-gal, o substrato dessa enzima. Neste experimento foram obtidos 10 clones positivos, ou seja, colônias azuis. A maioria deles correspondia a diferentes proteínas participantes do tráfego celular ou secretadas. Porém, 2 destes clones possuíam o cDNA que codificava a IL-15 humana (dados não publicados, veja esquema na figura 6).

Os resultados obtidos nos ensaios chamaram à atenção pelas características singulares de IL-15 humana, que ao contrário de outras citocinas, como IL-2 que tem sua expressão restrita à células do sistema imune, o mRNA de IL-15 é expresso constitutivamente por uma variedade de tipos celulares e tecidos, incluindo

monócitos/macrófagos, células dendríticas, queratinócitos e células da epiderme, fibroblastos e células epiteliais de várias origens, células nervosas, rim, placenta, pulmão, coração e músculo esquelético (Grabstein *et al.*, 1994; Musso *et al.*, 1999; Doherty *et al.*, 1996; Rückert *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1996; Quinn *et al.*, 1995).



**10 clones positivos  $\rightarrow$  2 clones = IL-15**

Figura 6: **Ensaio de duplo híbrido para testar possíveis proteínas que poderiam interagir com as amastinas.** A região codificadora da primeira alça hidrofílica da amastina foi clonada em fusão com a região codificadora do domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição Gal4 e usado como isca para seleção de uma biblioteca de cDNA humano contendo as regiões codificadoras de mais de 15 mil genes clonados em fusão com a região codificadora do domínio de ativação do fator de transcrição Gal4 (presa). Leveduras auxotróficas haploides contendo o plasmídeo da região codificadora da primeira alça hidrofílica da amastina foram cruzadas com as leveduras da biblioteca. A interação entre isca e presa induz a reconstituição do fator de transcrição Gal4, transcrevendo o gene repórter, que neste caso foi o que codifica a  $\beta$ -galactosidase. Dessa forma, em meio seletivo contendo o substrato X-gal, as colônias nas quais ocorrem interação entre a isca (amastina) e a presa (proteína humana) apresentam coloração azul.

Outro fato importante é que estudos anteriores apontaram o aumento dos níveis de IL-15 associados com a infecção por diversos patógenos. A infecção pelo vírus HHV-6 em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foi capaz de promover a regulação positiva da citotoxicidade de células *Natural Killer* (NK). Por outro lado, a indução da atividade das células NK pelo vírus HHV-6 foi anulada por anticorpos monoclonais anti-IL-15, mas não por anticorpos contra outras citocinas (IFN-alfa, IFN-gama, TNF-alfa, TNF-beta, IL-2, IL-12), sugerindo que a IL-15 secretada em resposta à infecção viral era responsável pelo efeito observado. Além disso, foi possível detectar a regulação positiva do mRNA de IL-15 em monócitos derivados de pacientes infectados pelo vírus HHV-6 (Flamand *et al.*, 1996).

*Cryptococcus neoformans* potentemente estimulou a liberação de IL-15 biologicamente ativa em monócitos. Tanto IL-15 como IL-2 contribuíram para a proliferação de linfócitos e atividade anticriptocócica mediada por linfócitos neste modelo de infecção. IL-15 foi capaz de restaurar a proliferação de linfócitos e sua atividade anticriptocócica mesmo durante o bloqueio de IL-2 (Mody *et al.*, 1998).

A presença de IL-15 em lesões cutâneas obtidas de pacientes com a doença de Hansen foi demonstrada por meio de exame imuno-histoquímico dessas lesões. Além disso, foi demonstrado que *Mycobacterium leprae* e diferentes espécies micobacterianas são capazes de induzir efetivamente a secreção de IL-15 em macrófagos. IL-15, também, melhorou o potencial citolítico das células efetoras imunes *in vitro* e favoreceu a expansão imunológica de células CD1b (Maeurer *et al.*, 1999).

Estudos que envolveram o efeito de diferentes vírus (HSV, EBV, vírus sincicial respiratório, vírus da estomatite vesiculosa, vírus da gripe, reovírus e vírus Sendai) sobre a atividade de NK *in vitro*, mostraram uma regulação positiva imediata da atividade de células NK das PBMC por meio da indução com IL-15. Este efeito foi revertido na presença de anticorpos anti-IL-15, confirmando a importância crucial desta citocina para esse tipo de resposta celular, bem como foi verificando um aumento dos níveis de IL-15 em 20 horas pós-infecção (Fawaz *et al.*, 1999).

Milano e colaboradores (2002) investigaram o envolvimento da IL-15 no sistema imunológico em resposta à infecção por *Leishmania infantum*, estudando pacientes com leishmaniose visceral (VL), demonstrando que IL-15 é produzida por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) estimuladas pelo antígeno

leishmanial (LAg) de pacientes com a doença ativa em um nível significativamente maior do que aqueles produzidos por células de indivíduos curados ou saudáveis. Um aumento significativo nos níveis séricos de IL-15 foi também observado em pacientes com VL aguda em comparação com os pacientes curados. Além disso, a IL-15 recombinante teve um efeito considerável na redução da IL-4 e aumento da produção de IL-12 em resposta a LAg.

Estudos envolvendo a infecção por *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, mostraram, através de análises de PCR e Western blot, o aumento da expressão de IL-15 durante estas infecções, juntamente com o aumento da proliferação de células NK, indicando que IL-15 também está envolvida na resposta imune inata contra agentes fúngicos e bacterianos (Tran *et al.*, 2003).

A resposta complexa de macrófagos murinos durante a infecção com *C. parapsilosis* foi investigada em nível da expressão de genes usando *microarray*. A maioria dos genes regulados positivamente codificou moléculas envolvidas na resposta imune e inflamação, transcrição, sinalização, apoptose, ciclo celular, transporte de elétrons e adesão celular. Típico dos macrófagos classicamente ativados, houve uma regulação positiva significativa de genes que coordenam a produção de citocinas inflamatórias, como TNF, IL-1 e IL-15 (Németh *et al.*, 2014).

Estudos recentes que envolveram a análise de transcriptoma mostraram a elevação dos níveis de mRNA de IL-15 durante a infecção por diversas cepas de *T. cruzi* e *Leishmania spp.* Células HFF humanas apresentaram níveis de mRNA de IL-15 aumentados durante a infecção pelas cepas Y (Li Y. *et al.*, 2016) e Sylvio X-10 (Houston *et al.*, 2016), apresentando aumentos de 1,5 e 1,7 vezes após 72 horas do início da infecção, respectivamente. Foram observados, também, o aumento dos níveis de mRNA de IL-15 em macrófagos humanos infectados por *L. major* e *L. amazonensis* (Fernandes *et al.*, 2016), com aumentos em 24 horas pós-infecção de 2,3 e 2 vezes, respectivamente. Análises em lesões de pacientes portadores de leishmaniose cutânea provocada por *L. braziliensis* (Christensen *et al.*, 2016) mostraram um *fold change* de 5,7 vezes nos níveis de mRNA quando comparados com tecido de pacientes saudáveis. Na análise de transcriptoma de macrófagos murinos infectados por *L. major*, foi observado um aumento dos níveis de mRNA de IL-15 após 48 horas do início da infecção, com aumentos de 3,4 vezes, porém foi verificado uma regulação negativa do mRNA nas horas iniciais da infecção,

apresentando um *fold change* negativo de 4,86 vezes (Dillon *et al.*, 2015). Um trabalho recente do nosso grupo de pesquisa que envolveu a análise de transcriptoma de células HFF infectadas pelos clones CL-Brener e CL-14 de *T. cruzi* também revelou aumento da produção de mRNA de IL-15 em 96 horas após o início da infecção, com *fold change* de 3,4 e 2,7 vezes, respectivamente (dados não publicados).

Existe apenas um trabalho publicado descrevendo o aumento da produção de IL-15 em pacientes com a doença de Chagas. Fonseca e colaboradores (2007) demonstraram que na doença de Chagas cardiomiopática crônica (CCC) ocorre a formação de um infiltrado inflamatório com predominância de 2:1 de células TCD8+ em relação às células TCD4+, aumento dos níveis de IL-15 sobre IL-2 e uma acentuada expansão e viabilidade de células TCD8+ de memória desses pacientes quando estimuladas com IL-15. Além disso, foi possível identificar por imunohistoquímica o aumento de IL-15 e células CD68+, que é um marcador específico de macrófagos, no tecido lesionado em comparação com indivíduos saudáveis.

### **1.6 Interleucina 15 (IL-15): uma citocina pleiotrópica da resposta inflamatória**

Interleucina-15 (IL-15) é uma citocina pleiotrópica pertencente à família das citocinas de 4- $\alpha$ -hélices que age principalmente durante a resposta inflamatória, atuando no aumento da proliferação de células NK e TCD8+ de memória, e inibindo a apoptose de vários tipos celulares (Budagian *et al.*, 2006) (figura 6). A esta família de citocinas pertencem, também, as citocinas IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7 e IL-21, bem como fatores de crescimento como: fator estimulador de colônia de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), eritropoietina e hormônios clássicos como fator de crescimento humano e prolactina (Bazan, 1990). IL-15 tem um papel importante na proliferação, sobrevivência e diferenciação de diferentes células, sendo identificada em 1994 por dois grupos de pesquisa distintos, quando chamou à atenção pela sua capacidade de mimetizar os efeitos de IL-2 em ensaios que estimulavam a proliferação de células T IL-2-dependentes (CTLL2) na presença de anticorpos anti-IL-2 (Burton *et al.*, 1994; Grabstein *et al.*, 1994). No primeiro estudo, pesquisadores do *National Institutes of Health* demonstraram que uma linhagem de células T leucêmicas, denominada HuT-102, secretava uma linfocina de 14 kDa que era capaz de estimular a proliferação de células T e ativação

de linfócitos granulares, denominando-a de IL-T (Burton *et al.*, 1994). Em um trabalho paralelo, cientistas da *Immunex Corporation* (Seattle, WA) fizeram a purificação de uma citocina de 14-15 kDa do sobrenadante de uma linhagem de células epiteliais de rim de macaco (CV-1/EBNA) por cromatografia seguida de sequenciamento. A esta citocina foi dado o nome de IL-15.

Essa citocina compartilhava muitas propriedades biológicas com IL-2 (Grabstein *et al.*, 1994), como por exemplo, o fato de IL-15 possuir 4- $\alpha$ -hélices, e também compartilhar com IL-2 a cadeia  $\beta$  e a cadeia gama comum ( $\gamma_c$ ), que fazem parte do seu receptor heterotrimérico, que também é composto pela subunidade  $\alpha$ , que por sua vez, é específica ao receptor de IL-15 (Giri *et al.*, 1994) (figura 6). A subunidade cadeia gama comum ( $\gamma_c$ ) também é compartilhada por outras citocinas como IL-7, IL-9 e IL-21, que também possuem uma subunidade específica em seu receptor, garantindo uma interação de alta afinidade ao ligante (Leonard *et al.*, 1995). IL-15 atua na modulação de uma resposta imune adaptativa seletiva (Lodolce *et al.*, 2002) e exerce um papel fundamental no desenvolvimento de distintas populações de células imunes, como as células NK, por exemplo (Becknell *et al.*, 2005).

Em sua estrutura, IL-15 possui 2 pontes de dissulfeto nas posições <sup>42</sup>Cys-<sup>88</sup>Cys e nas posições <sup>35</sup>Cys-<sup>85</sup>Cys e fortes seções helicoidais nas regiões 1-17, 18-57, 65-78 e 94-112 que, por sua vez, possibilitam a formação das 4- $\alpha$ -hélices (Grabstein *et al.*, 1994; Pettit *et al.*, 1997). Na sua extremidade C-terminal, IL-15 possui, também, dois potenciais sítios para N-glicosilação (Kurys *et al.*, 2000). Através de um *splicing* alternativo que geram 2 mRNAs distintos, há a formação de duas isoformas de IL-15, que se diferenciam apenas no tamanho do seu peptídeo sinal (Nishimura *et al.*, 2000; Prinz *et al.*, 1998), onde um dos transcritos, que possui um longo peptídeo sinal de 48 aminoácidos, é denominado IL-15LSP (do inglês “long signal peptide”) (Grabstein *et al.*, 1994), e outro transcrito que possui um curto peptídeo sinal de 21 aminoácidos é denominado IL-15SSP (do inglês “short signal peptide”) (Meazza *et al.*, 1996; Nishimura *et al.*, 2000). Estas duas isoformas de IL-15 apresentam diferentes padrões de distribuição intracelular, tráfego, secreção e localização endossomal, o que remete para o importante papel do peptídeo sinal nos diversos mecanismos de controle da produção de IL-15 (Meazza *et al.*, 1996; Nishimura *et al.*, 2000; Kurys *et al.*, 2000; Pereno *et al.*, 2000). Um fato importante é que IL15SSP, ao contrário de IL15LSP não é secretada, em vez disso, esta isoforma é estocada no citoplasma (Kurys *et al.*, 2000;

Gaggero *et al.*, 1999; Pereno *et al.*, 2000). As duas isoformas de IL-15 também apresentam localização nuclear, podendo ser observada uma clara localização de IL-15 e a subunidade de alta afinidade de seu receptor, a IL-15R $\alpha$ , na membrana nuclear e núcleo (Pereno *et al.*, 2000).

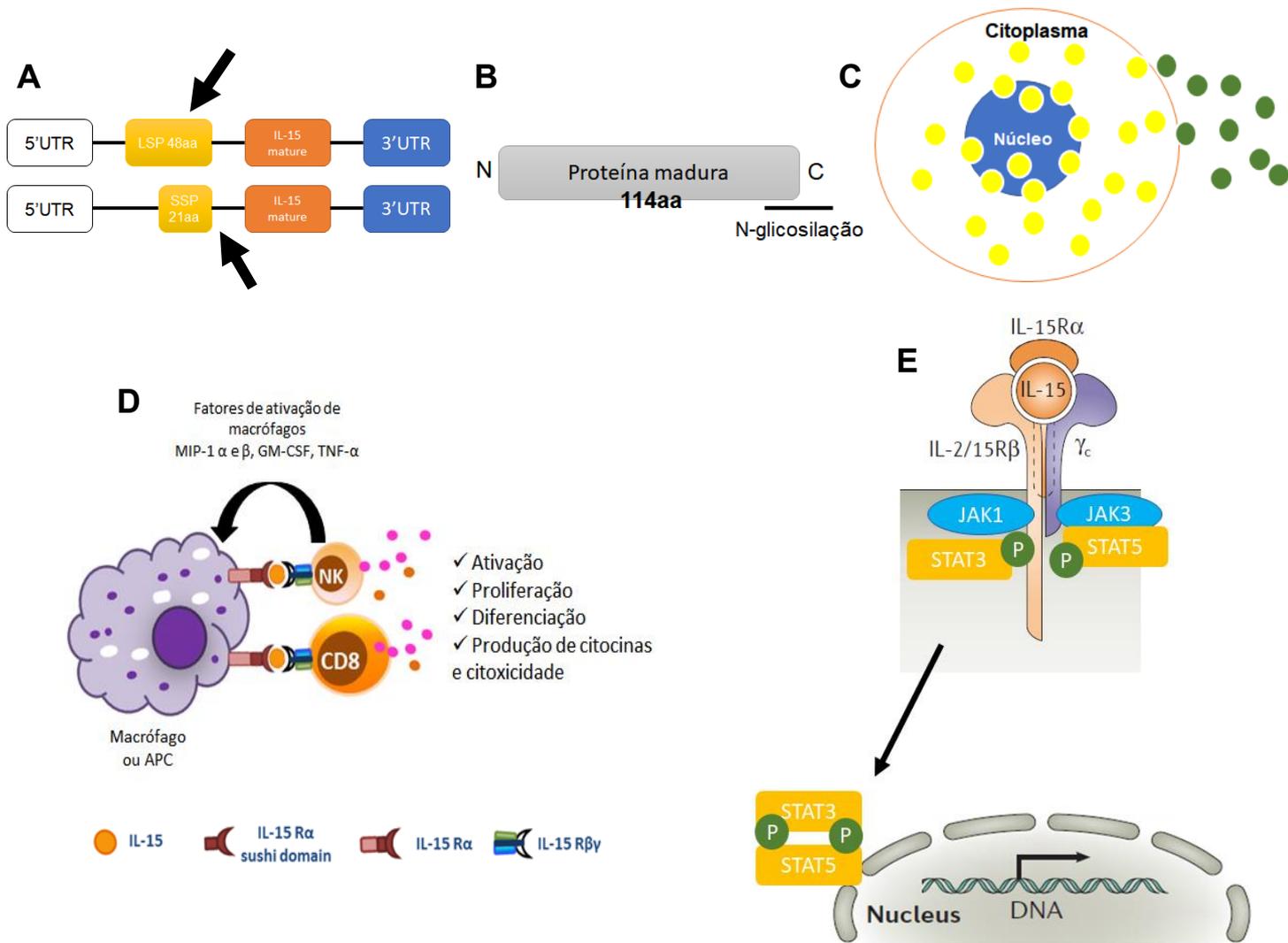
Diferentemente de outras citocinas, como IL-2 por exemplo, o mRNA de IL-15, que codifica uma proteína madura de aproximadamente 114 aminoácidos (Grabstein *et al.*, 1994), é expresso constitutivamente por uma variedade de tipos celulares e tecidos, incluindo monócitos/macrófagos, células dendríticas, queratinócitos e células da epiderme, fibroblastos e células epiteliais de várias origens, células nervosas, rim, placenta, pulmão, coração e musculo esquelético (Grabstein *et al.*, 1994; Musso *et al.*, 1999; Doherty *et al.*, 1996; Mattei *et al.*, 2001; Rückert *et al.*, 2000; Rappl *et al.*, 2001; Satoh *et al.*, 1998; Shinozaki *et al.*, 2002; Quinn *et al.*, 1995; Rückert *et al.*, 2009).

Existe um fino controle da produção de IL-15 que ocorre, em parte, pela presença de vários sítios e iniciação (AUG) localizados na região não codificadora 5' UTR, sendo no total 12 AUGs em humanos e 5 AUGs em camundongos. Experimentos que visavam elucidar a importância da presença desses AUGs no controle da expressão de IL-15 mostraram que a retirada de cada um desses códons antes do códon de início aumentava cerca de 10 a 15 vezes a produção de IL-15 (Bamford *et al.*, 1996).

A cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-15 (IL-15R $\alpha$ ) é uma proteína transmembrana tipo I (Anderson *et al.*, 1995; Giri *et al.*, 1995). A ligação de IL-15 com a cadeia  $\alpha$  do seu receptor ocorre independente da presença das subunidades  $\beta$  e  $\gamma$  (Giri *et al.*, 1995). Essa cadeia específica do receptor de IL-15 possui um curto domínio citoplasmático e uma região extracelular rica em prolina e treonina, que é um domínio responsável pela interação com IL-15 denominado domínio Sushi (Giri *et al.*, 1995). Os domínios Sushi são domínios que, também, contém 4 cisteínas que formam 2 pontes de dissulfeto ligadas por padrão 1-3 e 2-4, que também são encontrados em várias proteínas envolvidas na via do complemento e na cascata de coagulação. Esse domínio é essencial para interação do receptor com IL-15 (Perkins *et al.*, 1988; Wei *et al.*, 2001). IL-15R $\alpha$  contém apenas 1 domínio Sushi, porém IL-15 possui dois sítios de ligação para IL-15R $\alpha$ , onde ocorre uma ampla rede de interações iônicas entre IL-15 e IL-15R $\alpha$  (Giri *et al.*, 1995). Semelhantemente a IL-15, o mRNA de IL-15R $\alpha$  é

expresso em uma variedade de tipos celulares imunes e não imunes, como por exemplo: células T, células B, do cérebro, do intestino, do fígado, do músculo esquelético, do pulmão, do coração e do rim (Giri *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1995; Waldmann *et al.*, 1999; Fehninger *et al.*, 2001; Tejman-Yarden *et al.*, 2005; Schluns *et al.*, 2004).

Como mostra a figura 7, IL-15 se liga e desencadeia a sinalização através das cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  de seu receptor, que possuem afinidade intermediária pela citocina, participando tanto da ligação com IL-15, quanto da própria transdução de sinal. Estas cadeias não possuem atividade enzimática sendo, desta forma, a própria ligação com a citocina que causa a sua oligomerização. Todavia a sinalização por meio destas subunidades necessita de recrutamento de quinases no domínio citoplasmático destas moléculas (Cosman *et al.*, 1993). A sinalização mediada por IL-15 em linfócitos T resulta na ativação de Janus quinase (JAK) (que tem papel crítico na sinalização de diversos membros da superfamília de receptores de citocinas), culminando na ativação da proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição (STAT) (Johnston *et al.*, 1995; Leonard *et al.*, 2001). Assim que ocorre a interação do receptor com seu ligante, as JAKs associadas são colocadas próximas, porém em oposição, permitindo a sua fosforilação cruzada e consequente ativação. A cadeia  $\beta$  recruta JAK1 e a cadeia  $\gamma_c$  recruta JAK3. Dessa forma, é possível ocorrer a fosforilação e ativação de STAT3 e STAT5, respectivamente (Johnston *et al.*, 1995). Existem resíduos específicos de tirosina nos domínios citoplasmáticos das subunidades  $\beta$  e  $\gamma_c$  que também se fosforilam e são utilizados como sítios de encaixe para STAT (Gaffen *et al.*, 1998). Dessa forma, as proteínas STAT recrutadas são fosforiladas por JAK ativadas. As STATs fosforiladas em suas tirosinas formam homo e heterodímeros que se translocam para o núcleo afim de se ligar em seus elementos regulatórios no DNA alvo e ativar a expressão gênica (Leonard *et al.*, 2001).



**Figura 7: Principais características da produção e função de IL-15.** (A) Por meio de um *splicing* alternativo é possível haver duas isoformas de IL-15 que se diferem apenas no tamanho do peptídeo sinal (setas). Assim, a isoforma longa possui um peptídeo sinal de 48 aminoácidos, ao contrário da isoforma curta que possui um peptídeo sinal de 21 aminoácidos. (B) Ambas as isoformas acabam gerando uma proteína madura de 114 aminoácidos que possui potenciais sítios de N-glicosilação na extremidade C-terminal. (C) Devido a uma secreção ineficiente, a isoforma curta se localiza predominantemente no citoplasma da célula (amarelo), ao contrário da isoforma longa, que é secretada (vermelho). (D) IL-15 pode ser secretada ou encontrada associada à membrana celular via ligação com a cadeia  $\alpha$  de alta afinidade, que compõe seu receptor heterotrimérico. Por esse mecanismo, há ativação de diversas células do sistema imunológico durante a sinapse imunológica entre as células apresentadoras de antígeno e as células naturais células assassinas (NK) ou células T CD8+, por exemplo. IL-15R $\alpha$  presente na superfície de macrófagos ou células dendríticas, apresenta IL-15 em *trans* para células que expressam apenas IL-2/15R $\beta$  e  $\gamma_c$ , permitindo assim, a sinalização através desses complexos, o que induz a ativação da resposta imune, diferenciação, proliferação e inibição da apoptose nas células alvo. (E) A subunidade  $\alpha$  do receptor de IL-15 não é responsável pela transdução de sinal, visto que possui um curto domínio citoplasmático. Porém, se liga a IL-15 com alta afinidade, garantindo a especificidade da ligação. A transdução de sinal é mediada pelas subunidades  $\beta$  e  $\gamma$ , que possuem longos domínios citoplasmáticos e também são encontrados em receptores para outras citocinas. Estes dois receptores induzem uma sinalização convergente que envolve a ativação de JAK1 (Janus quinase 1), JAK3 e STAT5 e STAT3 (proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição 5 e 3). A interação de IL-15 com a cadeia  $\beta$  e a cadeia  $\gamma$  leva à fosforilação da receptor e de JAK1 e JAK3, que estão associados à cadeia  $\beta$  e à cadeia  $\gamma$ , respectivamente. STAT5 e 3 então associados com o receptor fosforilado são, também, fosforilados em um resíduo de tirosina. Isso resulta na dissociação de STAT5 e 3 do receptor e a subsequente dimerização de STAT5 e 3. Os dímeros STATs fosforilados então, translocam para o núcleo e promovem a transcrição de genes alvo, que geralmente estão envolvidos na resposta imune e ativação celular (Adaptado de Waldmann, 2006 e Guo *et al.*, 2017).

Tem sido demonstrado que a via de sinalização por IL-15 é capaz de ativar fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B e AP-1 e, também, ativar a proteína c-Myc (Zhu *et al.*, 1994; McDonald *et al.*, 1998; McDonald *et al.*, 2000).

Existem estudos que demonstram a existência de uma outra via, com receptor alternativo, em mastócitos mediada por IL-15, denominado IL-15RX, e que não exige a participação das cadeias  $\beta$  ou  $\gamma$ , também culminando na ativação de JAK2/STAT5 e Tyk2/STAT6 (Tagaya *et al.*, 1996; Masuda *et al.*, 2001; Masuda *et al.*, 2000).

Além das células T e NK, a sinalização mediada por IL-15 é capaz de afetar outros tipos celulares (Ohteki *et al.*, 2001; Ohteki *et al.*, 1998; Van Belle *et al.*, 2005; Lodolce *et al.*, 2002; Becknell *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2006), como por exemplo: neutrófilos e eosinófilos, estimulando a produção de IL-8 (McDonald *et al.*, 1998; Cassatella *et al.*, 2000; Musso *et al.*, 1999; Girard *et al.*, 1996; Girard *et al.*, 1998; Pelletier *et al.*, 2002; Bouchard *et al.*, 2004; Hoontrakoon *et al.*, 2002; Ottonello *et al.*, 2002; Watson *et al.*, 1998); no desenvolvimento e a proliferação de mastócitos (Galli *et al.*, 2005) em macrófagos (D'Agostino *et al.*, 2004; Maeurer *et al.*, 2000); e em células dendríticas durante a infecção por *Listeria monocytogenes* (Mattei *et al.*, 2001; Dubois *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2000). IL-15 também é capaz de estimular a formação de células tipo osteoclastos em cultura de medula de osso de camundongo *in vitro* (Ogata *et al.*, 1999). Também foi demonstrado que células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVEC) e células endoteliais das microvilosidades intestinais humanas (HIMEC) expressam mRNA de IL-15R $\alpha$  e IL-15, onde IL-15 estimulou angiogênese *in vivo* e *in vitro* (Nilsen *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2002; Angiolillo *et al.*, 1997). IL-15 é altamente expressa no músculo esquelético possuindo efeitos anabolizantes musculares *in vitro* semelhantemente a outro potente fator de crescimento, o IGF-1 (Quinn *et al.*, 1995). IL-15 e todas as três subunidades do IL-15R são amplamente expressas no sistema nervoso central de camundongos e humanos, incluindo o córtex frontal e parietal, hipocampo, medula espinhal, tálamo e cerebelo (Hanisch *et al.*, 1997; Kurowska *et al.*, 2002).

Apesar de existirem diversos trabalhos que elucidam a via de sinalização mediada por IL-15 e de seu papel estimulatório no sistema imune, poucos trabalhos investigam o papel da IL-15 intracelular durante a infecção por diversos patógenos. A maioria dos trabalhos publicados envolvem a quantificação da IL-15 secretada em

soro de pacientes acometidos com algum tipo de infecção, mostrando, na maioria das vezes, um aumento acentuado nos seus níveis.

Diante dos resultados obtidos nos ensaios de duplo híbrido, a possível interação entre amastina e IL-15 foi investigada através de experimentos de “pull down” *in vitro* (Dissertação de Mestrado de Ramon Mendes de Almeida, UFMG - 2010). Foram testadas IL-15 recombinantes fusionadas com uma cauda de histidina e a alça extracelular de amastina fusionada com a proteína GST. Os dados, entretanto, foram inconclusivos, sendo necessário a realização de novos experimentos de “pull down” ou de co-imunoprecipitação, utilizando extratos celulares de células que normalmente produzem IL-15.

Com base nos achados no ensaio de duplo híbrido e nos trabalhos documentados acerca da elevação dos níveis de IL-15 durante processos infecciosos, decidimos buscar informações sobre o padrão de expressão de IL-15 intracelular e secretada durante a infecção por *T. cruzi*, para em seguida realizar novos experimentos para verificar se há uma interação desta proteína com a forma amastigota do parasito e, no caso de haver essa interação, saber qual seria o papel da isoforma intracelular de IL-15 para sobrevivência do parasito no interior das células hospedeiras.

## 2. Objetivos

---

### 2.1 Objetivo Geral

- ✓ Investigar o papel de IL-15 na infecção por *T. cruzi* e outros parasitos intracelulares.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar os níveis de IL-15 secretada e não secretada em culturas de macrófagos peritoneais murinos, células L6, LLCMK2 ou H9C2 infectados por *T. cruzi*.
- ✓ Determinar os níveis de IL-15 secretada e não secretada em culturas de macrófagos infectados por *L. amazonensis*.
- ✓ Avaliar a localização e perfil de distribuição celular de IL-15 em culturas de macrófagos infectados por *T. cruzi* ou *L. amazonensis*, e células L6 infectadas por *T. cruzi*.
- ✓ Avaliar o perfil de infecção de macrófagos murinos previamente estimulados com IL-15 durante a infecção por *T. cruzi*.
- ✓ Avaliar o perfil de infecção de macrófagos murinos nocautes para IL-15 durante a infecção por *T. cruzi*.

## 3. Material e métodos

---

Todos os experimentos descritos neste trabalho seguiram a Lei 11.794 e as Diretrizes para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA) do CONCEA. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), com o número **305/2016**.

### 3.1 Obtenção de macrófagos intraperitoneais

Para obtenção de macrófagos peritoneais foram injetados 2-3 mL de tioglicolato na cavidade peritoneal dos camundongos. Após 72 horas do estímulo, os camundongos foram sacrificados e o peritônio foi exposto, onde foram injetados 7-10 mL de PBS 1X gelado e retirado o máximo possível de PBS 1X. O conteúdo foi transferido das seringas para um tubo de centrífuga de 50 mL e o volume foi completado para 40 mL com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 200 U/mL de penicillina G, e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, pH 7.4 (Gibco®, Life Technologies Corporation). O conteúdo foi centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C sem *break* ou com *break* brando. Após esta etapa de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado como descrito acima. A viabilidade das células foi avaliada pelo método de exclusão de Trypan.

### 3.2 Infecção de macrófagos peritoneais murinos com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y e promastigotas metacíclicas de *Leishmania amazonensis*

Os macrófagos peritoneais primários de C57BL/6 foram cultivados em meio RPMI 1640 suplementado como descrito no item 3.1 e plaqueados em placas de cultura de 24 poços (Corning) com lamínulas de vidro circulares esteréis de 13mm no fundo de cada poço (Glasscyto).

Para a infecção por *Leishmania amazonensis*, à cada poço, foram adicionados uma proporção de 10 parasitos, na forma promastigota metacíclica, por macrófago e mantidos em meio RPMI 1640 completo. Após 24 horas de infecção, as células foram

lavadas com meio RPMI 1640 completo a fim de remover os parasitos que não foram internalizados e mantidas em diferentes períodos à 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para a infecção por *Trypanosoma cruzi*, a cada poço foram adicionados uma proporção de 5 parasitos, na forma tripomastigota, por macrófago e mantidos em meio RPMI 1640 completo. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas com RPMI 1640 completo para remover parasitas que não foram internalizados e mantidas em diferentes períodos a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para análise por ELISA, 1x10<sup>6</sup> células foram plaqueadas e infectadas com *T. cruzi* ou *Leishmania amazonensis*. As amostras do extrato celular e o sobrenadante das culturas celulares foram analisadas por diferentes tempos.

Para os ensaios de imunofluorescência, 5x10<sup>5</sup> células foram plaqueadas, e a infecção foi avaliada por diferentes períodos. Após cada período, as lamínulas eram fixadas com acetona por 30 segundos e guardadas em freezer a -20°C até o momento das marcações com anticorpos.

Para os ensaios em que foram verificados os índices de infecção, 5x10<sup>5</sup> células foram plaqueadas e a infecção observada em diferentes períodos. Ao final de cada tempo, as lamínulas eram lavadas 2 vezes com PBS 1X e coradas com panótico rápido LB (Laborclin – código 620529) para contagem.

### **3.3 Cultivo das linhagens celulares LLCMK2, L6 e H9C2**

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho foram LLCMK2, L6 e H9C2, cujas informações adicionais constam na tabela 1. Estas células foram cultivadas em garrafas de cultura celular (25cm<sup>2</sup> ou 75cm<sup>2</sup>) em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich) acrescido de 1% de antibiótico contendo 200 U/ml de penicillina G e 100 µg/ml de sulfato de streptomina, pH 7.4 e suplementado com 10% de soro fetal bovino. A cultura foi mantida em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, e o crescimento celular foi visualizado diariamente em microscópio óptico invertido.

Para manutenção das células, o meio de cultivo das garrafas com confluência total foi removido, e as células foram lavadas com 3-5 ml de PBS 1X estéril, pH 7.4. A garrafa foi incubada com 1-3 ml de solução de tripsina-EDTA (0.05%/0.02%) por 5-10 minutos, a 37°C para desprendimento das células aderidas na superfície de cultivo. Em seguida, para inativação da tripsina-EDTA, foi adicionado 1-3 ml de meio DMEM

completo como descrito acima, e as alíquotas das suspensões celulares obtidas foram transferidas para novas garrafas com DMEM completo.

Para produção de estoques celulares, as células foram periodicamente removidas, quantificadas e ressuspensas em soro fetal bovino acrescido de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) estéril. Essas suspensões foram armazenadas em tubos de criopreservação a  $-20^{\circ}\text{C}$  *overnight* e, em seguida, transferidas para *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$ , mantidas por até 3 meses.

Quando as células eram destinadas aos ensaios de infecção, eram cultivadas em garrafas com meio de cultura DMEM + 10% soro fetal bovino + 1% de antibiótico até atingirem uma confluência de 80%. Ao atingirem essa confluência (período de 5 a 7 dias), era feita a tripsinização e contagem das células. Uma parte dessas células era plaqueada em placas de 24 poços, e cultivadas com meio de cultura DMEM + 5% soro fetal bovino + 1% de antibiótico, e o restante das células era transferido para uma garrafa e expandido para posterior congelamento.

Tabela 1: Informações sobre as linhagens celulares utilizadas neste trabalho

Linhagem	Organismo de origem	Tipo celular	Tecido de origem	Código
L6	<i>Rattus norvegicus</i> (rato)	Mioblasto	Músculo esquelético	ATCC CRL-1458
LLC-MK2	<i>Macaca mulata</i> (Macaco, Rhesus)	Epitelial	Rim	ATCC CCL-7
H9C2	<i>Rattus norvegicus</i> (rato)	Mioblasto	Miocárdio	ATCC CRL-1446

Fonte: <https://www.atcc.org>

### **3.4 Cultivo das formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi***

As formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram coletadas do sobrenadante de células LLCMK2 infectadas e cultivadas em meio DMEM acrescido de 1% de antibiótico, enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> por 5-6 dias, que foi o tempo necessário para se observar a ruptura das células e, conseqüentemente, tripomastigotas no sobrenadante. Assim, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 1000 g por 10 minutos. O pellet foi ressuspenso em 1-3 ml de meio DMEM completo como descrito acima. Após possíveis diluições, uma alíquota de 10 µl foi utilizada para contagem na câmara de Neubauer e o total de parasitos obtidos foi utilizado nos experimentos e infecção.

### **3.5 Infecção de células LLCMK2, L6 e H9C2 com formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y**

Células LLCMK2, L6 ou H9C2 foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 24 poços (Corning) contendo lamínulas de vidro circulares esteréis, de 13 mm, no fundo de cada poço (Glasscyto).

Para análise por ELISA,  $5 \times 10^5$  células foram plaqueadas, infectadas na proporção de 5 tripomastigota por célula. Foram obtidas amostras do extrato e sobrenadante das culturas celulares e a infecção foi avaliada em diferentes períodos.

Para os ensaios de imunofluorescência,  $5 \times 10^4$  células foram plaqueadas e infectadas. As lamínulas eram fixadas com acetona por 30 segundos e guardadas em freezers a -20°C até o momento das marcações com anticorpos.

Para os ensaios em que foram verificados os índices de infecção,  $5 \times 10^4$  células foram plaqueadas e a infecção observada em diferentes períodos. Ao final de cada tempo, as lamínulas eram lavadas 2 vezes com PBS 1X e coradas com panótico rápido LB (Laborclin – código 620529) para contagem.

### **3.6 Obtenção das formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania amazonensis***

Os cultivos da forma promastigota de *Leishmania amazonensis*, gentilmente fornecido pela Profa. Maria de Fátima Martins Horta do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, foram mantidos por passagens semanais no meio de cultura Schneider recentemente preparado (Sigma-Aldrich Cat. No. S9895) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor.

Para purificação das formas promastigotas metacíclicas, as *Leishmanias* foram cultivadas por 3 a 4 dias (no caso da *Leishmania amazonensis*). Após isso, a cultura da garrafa foi transferida para um tubo de centrífuga de 50 mL e lavada duas vezes com PBS 1X para remover parasitas aderidos. O tubo de centrífuga foi passado ligeiramente no vórtex para soltar os grumos de *Leishmanias*. Após isso, o tubo foi centrifugado a 500 rpm por 4 minutos a 4°C para remover possíveis resíduos, e o sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo de 50 mL.

Assim, houve mais uma etapa de centrifugação a 3.300 rpm por 15 minutos a 4°C. Durante a centrifugação foi preparado o reagente ficoll 10% para, em seguida, montar um gradiente, adicionando ficoll 20% em um tubo de centrífuga de 15 mL. Após a centrifugação da cultura de parasito, o precipitado foi ressuspenso em 2 mL de PBS 1X estéril. O ressuspenso foi adicionado lentamente sobre o gradiente de ficoll pela parede do tubo com auxílio de uma pipeta. O gradiente foi centrifugado a 2.500 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado, rapidamente, por cima do anel esbranquiçado com o cuidado de evitar a desorganização do gradiente e, também, devido a toxicidade do ficoll. Ao sobrenadante foram adicionados aproximadamente 40mL de PBS 1X e centrifugado a 3.300 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspenso em 1 mL de PBS 1X. O procedimento foi repetido por, no mínimo, duas vezes. O número de parasitos foi quantificado em câmara de Neubauer.

### **3.7 Animais**

Todos os camundongos utilizados para realização dos experimentos deste projeto foram C57BL/6 machos, obtidos no biotério de criação do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a partir da matriz de camundongos nocautes para IL-15 gentilmente cedidos pelo Dr. Herbert Tanowitz, gerados no “Institute for Animal Studies do Albert Einstein College of Medicine”, nos EUA, conforme descrito por Kennedy e colaboradores (2000). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, ambiente com temperatura controlada ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro (12-12h). Os animais tiveram à disposição ração padrão e água de torneira filtrada.

### **3.8 Obtenção das amostras da cauda de camundongo para genotipagem**

Amostras da cauda de camundongos isogênicos do biotério de produção da UFMG, foram coletados cortando-se aproximadamente 0,5 cm da cauda de cada camundongo pressionando a cauda com uma pinça próximo ao local do corte. Para isso foi administrada, previamente, cloridrato de lidocaína (pomada) 50mg (EMS S/A), para anestésiar o local do corte. Todo material utilizado para a retirada da amostra das caudas era higienizado e destinado, unicamente, para esse fim. Após esse procedimento, as amostras eram acondicionadas em tubos de polipropileno etiquetados e as amostras da cauda eram imediatamente incubadas com a solução de lise para extração do DNA.

### **3.9 Extração de DNA pelo protocolo de fenol/clorofórmio**

Os camundongos tiveram aproximadamente 0,5 cm da cauda removido e incubado, *over night* a  $55^{\circ}\text{C}$ , com 400 uL de solução de extração contendo 100 mM de Tris-HCl, EDTA 5mM (pH 8,5), SDS 0,2% e NaCl 200 mM. No momento do uso, a esta solução, eram adicionados 2 uL de proteinase K (100 ug/mL).

No dia seguinte, caso ainda existisse algum pedaço de tecido, era necessário agitar o tubo no vórtex até a cauda dissolver por completo. Em seguida, a amostra era centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e incubado com 700 uL de Fenol/Clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1).

Após isso, a amostra foi agitada por 1 hora no *shaker* (com inversão), em velocidade de 1.500 rpm. Novamente houve uma etapa de centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente.

A fase aquosa superior que se formou foi colatada e incubada com Fenol/Clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Neste estágio, a amostra foi agitada por 1 hora no *shaker* (com inversão), em velocidade de 1.500 rpm, seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa superior foi coletada e a esta foram adicionados 600 uL de etanol PA (Merk), com incubação a -20°C por uma hora. Após esse período, o tubo que continha amostra foi invertido até formar um precipitado. A amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos à 4°C e o sobrenadante foi descartado e incubado com 500uL de etanol 70% gelado. A amostra foi centrifugada a 14.000 rpm, por 5 minutos à temperatura ambiente à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 30 uL de Tris-EDTA. A amostra de DNA foi quantificada em espectrofotômetro (Nanodrop™ ou GeneQuant 1300).

### 3.10 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA purificado a partir da cauda de camundongo foi empregado como molde nas ampliações por PCR para genotipagem dos camundongos a fim de distinguir os animais nocautes para IL-15, que foram usados nos experimentos, dos animais selvagens e heterozigotos que possivelmente foram usados na geração da colônia IL-15 nocaute.

As reações de PCR foram feitas em um volume total de 20 µL, utilizando-se 100 ng de DNA genômico de camundongo, 0,5 µM de cada iniciador (Senso 1 – TGGCCTCTGTTTTAGGGAGA e anti-senso 1 – AGGCCATCTCAGGAAGATCA; que amplificariam o gene de IL-15 em um fragmento de 361 pares de bases em animais selvagens e heterozigotos; e senso 2 – CGTTGGCTACCCGTGATATT e anti-senso 2 – AGAAGGCTTTGCAATGTTCA, que amplificariam o gene de IL-15 interrompido pelo gene da proteína que confere resistência a neomicina com um fragmento de 308 pares de bases em animais heterozigotos e nocautes) (figura 8); 0,2 mM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 1X de tampão Go Taq (Promega) contendo 1,5mM de

MgCl<sub>2</sub>; 1,25 Unidades de Taq DNA polimerase (Promega) e água para completar o volume.

As reações foram incubadas no termociclador ProFlex PCR System (Biosystems), utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos; 30 ciclos de 95°C por 1 min, anelamento de 52°C por 1 min e extensão a 72°C 1 min; além de uma extensão final a 72 °C por 12 minutos. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TAE 1X, contendo 10% de SYBR™ Safe (Thermo Fisher) e visualizados em luz UV.

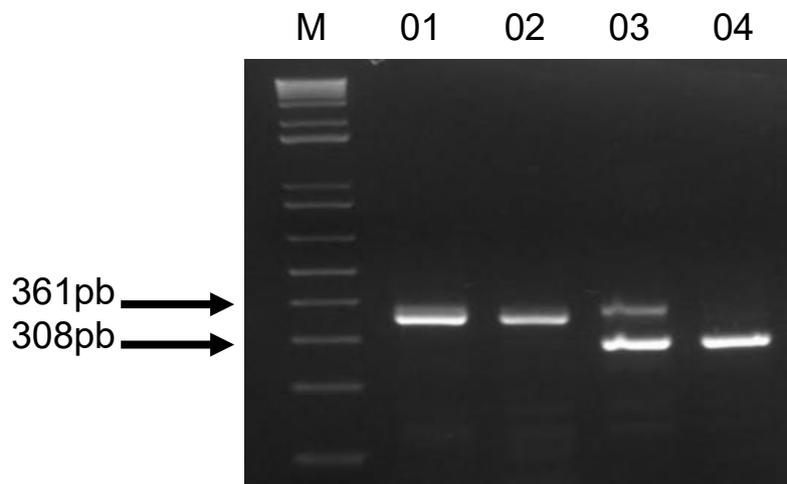


Figura 8: **Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando a genotipagem dos camundongos a serem utilizados nos experimentos de infecção.** O DNA genômico dos camundongos candidatos a serem utilizados nos experimentos de infecção foi purificado utilizando o protocolo com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), e utilizado como molde na PCR na qual foram empregados iniciadores que amplificavam um fragmento de 361 pares de bases, que correspondia ao gene de IL-15 não interrompido, e também, iniciadores que amplificavam um fragmento do gene que confere resistência a neomicina, o qual foi utilizado para interromper o gene de IL-15 gerando os animais IL-15 nocautes. Dessa forma, para os animais selvagens (canaletas 01 e 02) é possível observar apenas bandas correspondentes ao fragmento de 361 pares de bases, ao contrário dos animais nocautes (canaleta 04), em que é possível observar apenas a banda correspondente ao fragmento de 308 pares de bases. Para os animais heterozigotos é possível observar a presença das bandas correspondentes aos dois fragmentos.

### 3.11 Índices de infecção

Para avaliar os índices de infecção das células infectadas tanto por *T. cruzi* ou *L. amazonensis*, as lâminas de infecções de diferentes períodos foram coradas com panótico rápido LB (Laborclin – código 620529). Foram contadas 300 células totais e as contagens foram feitas em triplicata. Destas 300 células, foram contadas o número de células infectadas e a quantidade de parasitos em cada célula infectada.

Para os cálculos da porcentagem de células infectadas foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de células infectadas} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de células}}$$

Para determinar o número de amastigotas a cada 100 células infectadas foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de amastigotas}}{\text{n}^\circ \text{ de células infectadas}} \times 100$$

### 3.12 Medição da produção óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi analisada indiretamente pela leitura colorimétrica do nitrito em sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados por *T. cruzi* nos diferentes tempos de infecção pelo reagente de Griess, conforme descrito por Green *et al.* (1992). Foram coletados 50µl do sobrenadante por poço, misturados na proporção de 1:1 com o reagente de Griess [1 volume de 1% de Sulfanilamida ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) em 2,5% de ácido ortofosfórico em água deionizada com volume igual de 0,1% de N-(1- Naptil) -Etilenediamida (NEED) em água deionizada] em placa de 96 poços. Após 10 min, a mistura foi submetida à leitura num espectrofotômetro para placa de 96

poços utilizando 540 nm como comprimento de onda. A concentração foi calculada por uma curva padrão pré-calibrada usando nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) 10 mM diluído em meio de cultura como padrão (Ding *et al.*,1988).

### 3.13 ELISA

Para obtenção do extrato celular, as células foram lisadas durante 5 minutos à temperatura ambiente em um tampão de lise contendo EDTA 1X, SDS 3%, Tris-HCl pH 7,5 (10Mm) e PMSF (0,7mM).

Em relação as amostras de sobrenadante analisados, foram retirados 100 uL do total de 300 uL para análise por ELISA, utilizando o kit DuoSet ELISA (DY447), da R&D Systems. O anticorpo de captura foi diluído 1:120 em 100uL PBS 1X. O volume foi imediatamente pipetado em uma microplaca de 96 poços. A placa foi incubada à temperatura ambiente *over night*.

No dia seguinte, o anticorpo de captura foi aspirado e cada poço foi lavado 3 vezes, enchendo cada poço com 400uL de tampão de lavagem contendo Tween 20 (0,05%) em PBS 1X (pH 7,2-7,4). Em seguida, os poços foram bloqueados com adição de 300  $\mu\text{L}$  do reagente diluente, contendo BSA 1% filtrado em filtro de 0.2 micrômetros ou 5% de leite em pó desnatado (Molico), ambos diluídos em PBS 1X (pH 7,2-7,4). A placa foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora, e após esse tempo foi repetida a etapa de lavagem por 3 vezes com tampão de lavagem. Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da amostra para análise e também, 100  $\mu\text{L}$  do padrão, que fora previamente diluído em reagente diluente, usando 7 pontos para curva padrão, sendo a maior concentração de 8000 pg/mL e diluições seriadas de 2 vezes. A placa foi coberta com fita adesiva e incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo houve aspiração do material, seguida de 3 lavagens com tampão de lavagem. Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do anticorpo de detecção, diluído 1:60 em 100uL de reagente diluente em cada poço. A placa foi novamente coberta com fita adesiva e incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo, foi feita a aspiração do material, seguida de 3 lavagens e adicionados 100  $\mu\text{L}$  da solução de Streptavidina conjugada com HRP, diluída 1:40 em reagente diluente em cada poço. A placa foi coberta com fita adesiva e incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente, sem exposição direta à luz. Depois de aspirado e lavado todo o material, foram

adiicionados 100 µL da solução de substrato, contendo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e tetrametilbenzidina (TMB) na razão de 1:1 a cada poço, e a placa foi incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente sem contato direto com a luz. Após esse tempo, foram adicionados em cada poço, 50 µL da solução de parada contendo 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A densidade óptica foi determinada, imediatamente, usando um leitor de microplacas ajustado para 450 nm.

### **3.14 Imunofluorescência por microscopia confocal para detecção de IL-15**

As células cultivadas em lamínulas de vidro foram lavadas com PBS 1X e fixadas com acetona a 4° C por 1 minuto. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes com solução de PBS 1X. O bloqueio e a permeabilização foram feitos com PBS 1X contendo 2% BSA e saponina 0,5% durante 20 minutos à temperatura ambiente. No caso da marcação de macrófagos murinos, uma vez que nestas células há a presença de receptores Fc na sua membrana, foi necessária a incubação adicional de um anticorpo *Fc Block* [BD Pharmingen CD16/CD32 (2 4G2)] diluído 1:100 em solução de bloqueio por 30 minutos. A incubação com anticorpo primário foi feita usando anti-IL-15 de camundongo policlonal produzido em cabra (R&D Systems – código AF447) diluído 1:10 em 30uL de PBS 1X com 2% BSA e saponina 0,5% foi feita durante 45 minutos. Deste modo, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X durante 5 minutos e incubadas com anticorpo anti-IgG de cabra conjugado com Alexa488 ou Alexa594 (Donkey α-Goat, Molecular Probes), diluído 1:100 em 30uL de PBS 1X com 2% BSA e saponina 0,5% por 1 hora. As células foram lavadas novamente com PBS 1X como descrito anteriormente, com o acréscimo de mais 3 lavagens apenas com PBS 1X. Em seguida, as lamínulas foram incubadas com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma Aldrich), diluído 1:1000 em 30uL de PBS 1X, seguido de 3 lavagens com PBS 1X.

As lamínulas foram montadas com gel de montagem anti-*fading p-Phenylenediamine* (PPD) e seladas com base esmalte transparente. As imagens foram capturadas no microscópio invertido de fluorescência por microscopia confocal Nikon Ti C2 equipado com objetiva de 60x do *Center for Gastrointestinal Biology*, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

### 3.15 Comparação do sinal da fluorescência pelo cálculo da Fluorescência Total Celular Corrigida (CTCF)

Com o auxílio do software ImageJ foi possível obter alguns valores necessários para se calcular os valores de CTCF. Para isso, as células de cinco campos diferentes foram selecionadas, gerando valores de densidade integrada, área da célula e média de cinza. Para correção dos valores, em cada figura foram selecionadas 3 áreas, de qualquer tamanho, que não possuíam fluorescência, a qual chamamos de fundo. Com os valores obtidos, utilizamos a seguinte fórmula:

$$\text{CTCF} = \text{Densidade da Integrada} - (\text{Área da célula selecionada} \times \text{Média da fluorescência da leitura do fundo})$$

### 3.16 Infecção de células previamente estimuladas com IL-15 recombinante

Macrófagos peritoneais murinos obtidos a partir do estímulo inflamatório por tioglicolato foram plaqueados e cultivados conforme descrito no item 3.5 e estimulados com 10 ng/mL de IL-15 recombinante por 24 horas (R&D Systems) em cada poço. Assim, no dia seguinte, estas células foram infectadas com *T. cruzi* na razão de 5:1 parasitos por células. Os índices de infecção foram observados em diversos tempos por meio da observação, em microscópio, das lamínas coradas com panótico rápido LB.

### 3.17 Análises estatísticas

Os gráficos foram feitos plotando os resultados das contagens das triplicatas de cada experimento com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). As análises estatísticas foram feitas utilizando os métodos *One way ANOVA* e *Tukey's test* como pós teste ou *Two way ANOVA* e *Bonferroni's Multiple Comparison* como pós teste.  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$  foram considerados significativos, equivalendo \*, \*\* e \*\*\*, respectivamente. Os experimentos foram repetidos, no mínimo 3 vezes de forma independente.

## 4. Resultados

---

### 4.1 Detecção de IL-15 no sobrenadante e em extrato celular de macrófagos infectados com *T. cruzi*

Macrófagos murinos foram infectados na proporção de 5 tripomastigotas por célula hospedeira. As células foram coradas e a porcentagem de células infectadas e o número de amastigotas a cada 100 células infectadas em diferentes tempos foram determinados. Os dados na figura 9A mostram que as porcentagens de células infectadas foram de 38%; 49,33% e 67% em 24, 48 e 72 horas pós-infecção, respectivamente. Os dados na figura 9B mostram um aumento no número de amastigotas a cada 100 células infectadas, sendo de 255,4; 821,4 e 960,1 em 24, 48 e 72 horas após o início da infecção, respectivamente. Assim, os extratos celulares e sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais murinos infectados com *T. cruzi*, durante os tempos de 24, 48 e 72 horas, foram utilizados em ensaios de ELISA para a avaliação da expressão de IL-15. Os níveis de IL-15 secretada no sobrenadante da cultura de macrófagos foram indetectáveis. Por outro lado, a análise do extrato celular de macrófagos infectados por *T. cruzi* apresentou aumentos de 3,6 vezes e 1,99 vezes nos níveis de produção de IL-15 nos tempos de 24 e 48 horas pós-infecção, respectivamente (Figura 10). Após 24 horas de infecção, os níveis de IL-15 detectados diminuíram sendo que, com 72 horas, foram observados valores próximos aqueles encontrados em macrófagos não infectados.

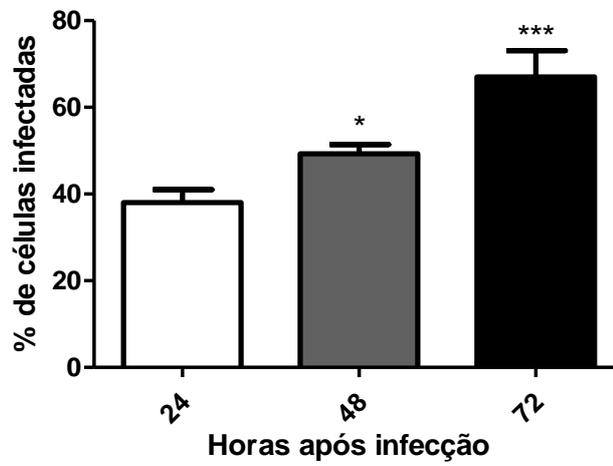
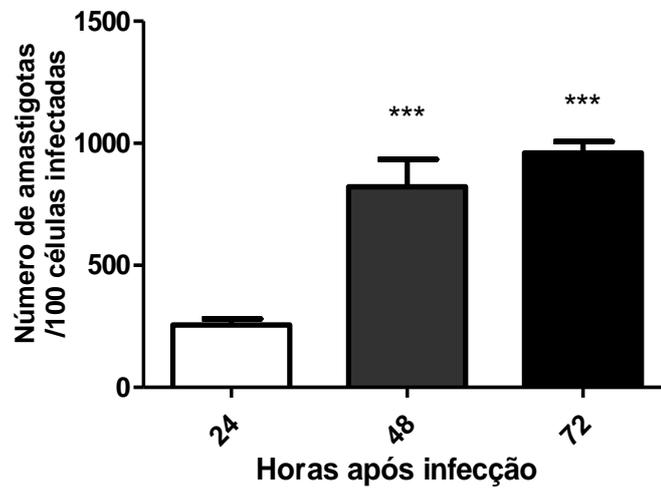
**A****B**

Figura 9: **Porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por 100 células infectadas em macrófagos peritoneais murinos infectados com tripomastigotas de *T. cruzi*.** Macrófagos peritoneais murinos foram infectados na proporção de 5:1 tripomastigotas por célula. **(A)** Porcentagens de células infectadas em diferentes tempos de infecção. **(B)** Número de amastigotas por 100 células infectadas. No eixo x do gráfico estão indicados os tempos de infecção. O asterisco acima de cada barra contida no gráfico representa uma diferença estatisticamente significativa comparada com o primeiro tempo observado ( $p < 0,05 = *$  e  $p < 0,001 = ***$ ).

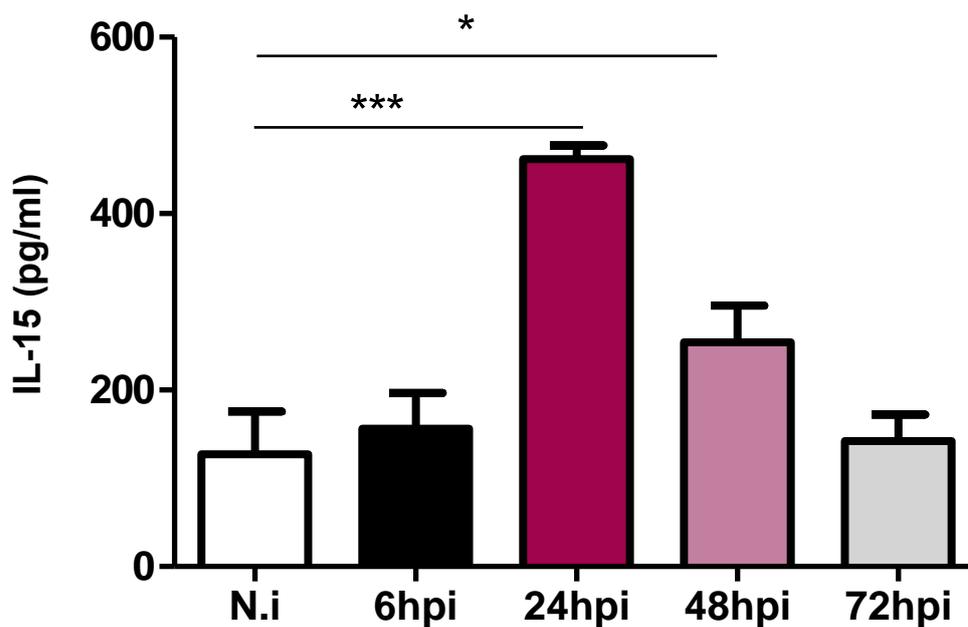


Figura 10: ELISA de extrato celular de macrófagos peritoneais mostrando os níveis de IL-15 em resposta a infecção por *T. cruzi*.  $1 \times 10^6$  Macrófagos peritoneais murinos/poço foram infectados com a forma tripomastigota de *T. cruzi* numa razão de 5:1 parasitos por célula. No eixo x do gráfico estão indicados os tempos de infecção e no eixo y do gráfico estão indicadas as concentrações de IL-15. Os tempos de infecção observados foram 6, 24, 48 e 72 horas. O asterisco acima de cada barra contida no gráfico representa uma diferença estatisticamente significativa em comparação com as células não infectadas ( $p < 0,05 = *$  e  $p < 0,001 = ***$ ).

## 4.2 Imunolocalização de IL-15 em macrófagos murinos infectados por *T. cruzi*

Por sua localização na membrana do parasito e por possuir duas alças hidrofílicas voltadas para o lado de fora da membrana do parasito (Teixeira *et al.*, 1994), estando dessa forma em constante contato com as proteínas citoplasmáticas das células hospedeiras, nós levantamos a hipótese de que o parasito poderia interagir com IL-15 via amastinas e/ou outras proteínas associadas a esta. Baseado nos resultados de ELISA que mostraram um aumento de IL-15 no extrato celular de macrófagos peritoneais murinos, experimentos de imunofluorescência e análise por microscopia confocal, utilizando um anticorpo anti-IL-15 e um anticorpo secundário conjugado com o fluorocromo Alexa 594, foram feitos para verificar a existência de co-localização de IL-15 com as formas amastigotas de *T. cruzi*. Na figura 11.1 é mostrada a localização intracelular de IL-15 com uma distribuição difusa e uniforme nas porções citoplasmática e nuclear para células não infectadas. E nas células infectadas foi observada a predominância de IL-15 na porção citoplasmática com prevalência sobre a porção nuclear. Na figura 11.2, por meio de amplificação da imagem, é possível observar regiões onde há polarização de IL-15 citoplasmática para próximo do parasito. Na figura 12 são mostrados os controles da imunofluorescência de macrófagos peritoneais murinos infectados por *T. cruzi*, nos quais foram utilizados apenas a marcação com anticorpo secundário, a fim de certificar a não existência de marcação inespecífica. O sinal de fluorescência, nessas células, foi quantificado e convertido em unidades de fluorescência total celular corrigida (CTCF), o que permitiu verificar que, em macrófagos peritoneais murinos infectados por *T. cruzi*, houve um aumento na CTCF comparado com os valores da CTCF das células não infectadas (figura 13A). Sabendo que a infecção por *T. cruzi* induz a produção de IL-15 citoplasmática em macrófagos murinos, a nossa próxima pergunta foi se essa proteína produzida tendia a se concentrar em alguma região específica da célula. Após a quantificação da fluorescência da região citoplasmática e nuclear, foi observado um aumento da fluorescência na região citoplasmática das células infectadas quando comparadas com as células não infectadas (figura 13B).

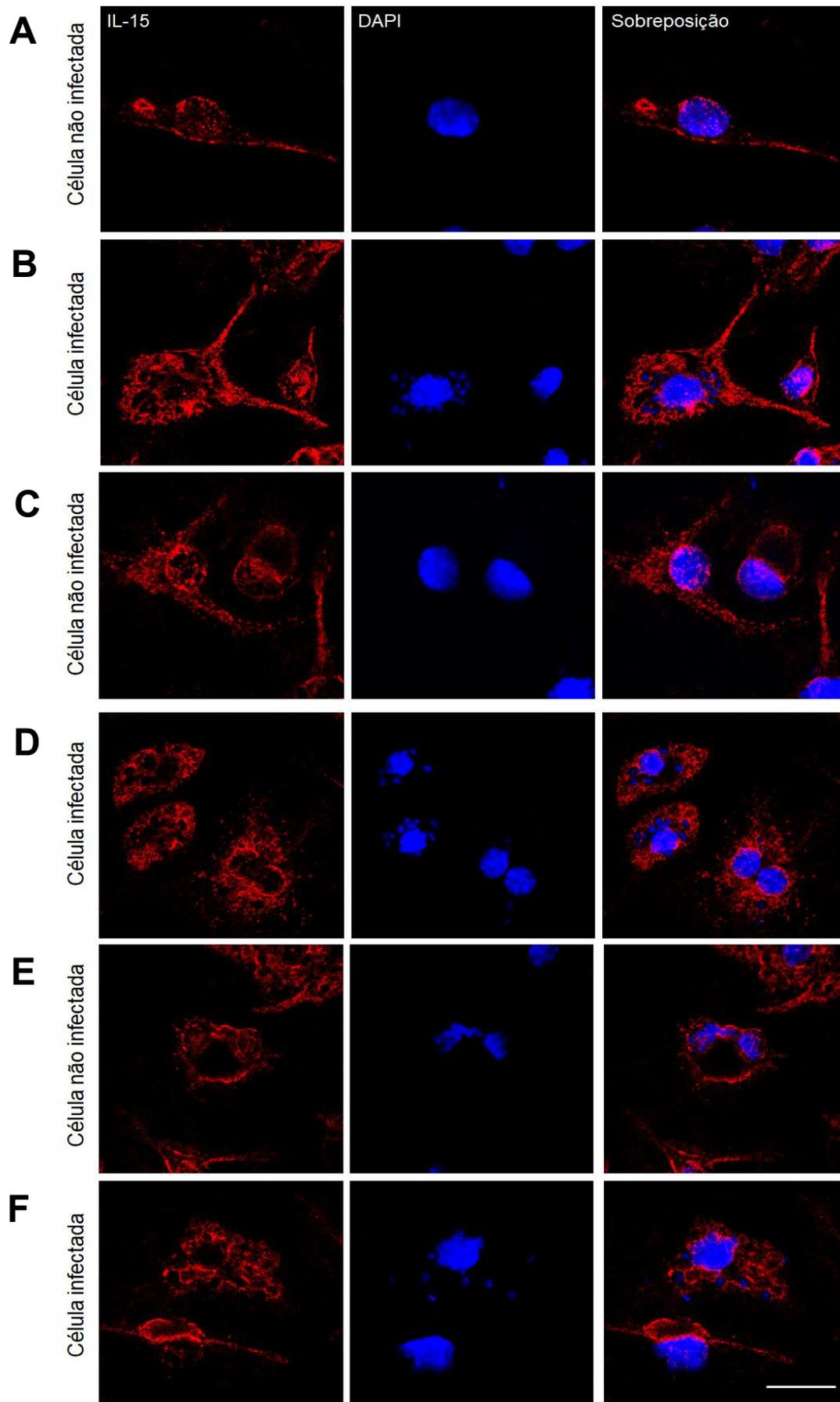


Figura 11.1: **Localização de IL-15 citoplasmática de macrófagos murinos durante a infecção por *T. cruzi*.** Nas células infectadas (24hpi) (B, D e F) é possível observar a polarização de IL-15 (vermelho) para próximo do parasito, se encontrando predominantemente na região do citoplasma da célula, ao contrário das células não infectadas (A, C e E), nas quais a IL-15 se encontra distribuída de forma difusa. O DAPI (azul) indica a localização de material genético tanto do macrófago quanto do parasito. Barra = 10 $\mu$ m.

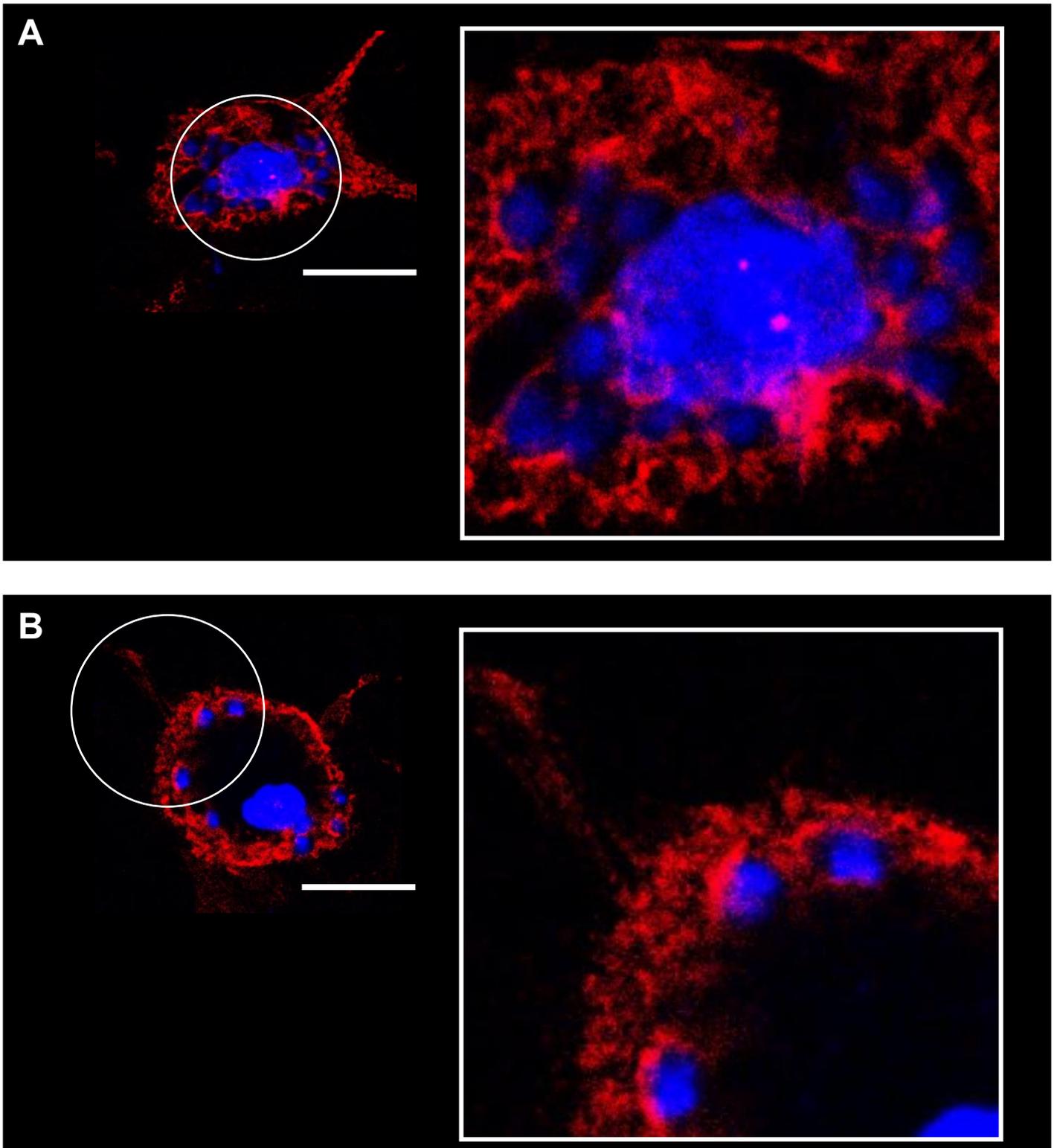


Figura 11.2: **Localização de IL-15 citoplasmática de macrófagos murinos durante a infecção por *T. cruzi* (com amplificação da imagem).** Nas células infectadas (A e B) é possível observar uma tendência à polarização de IL-15 (vermelho) em regiões próximas ao parasito (região destaca pelo círculo). O DAPI (azul) indica a localização de material genético tanto do macrófago quanto do parasito. Barra = 10 $\mu$ m.

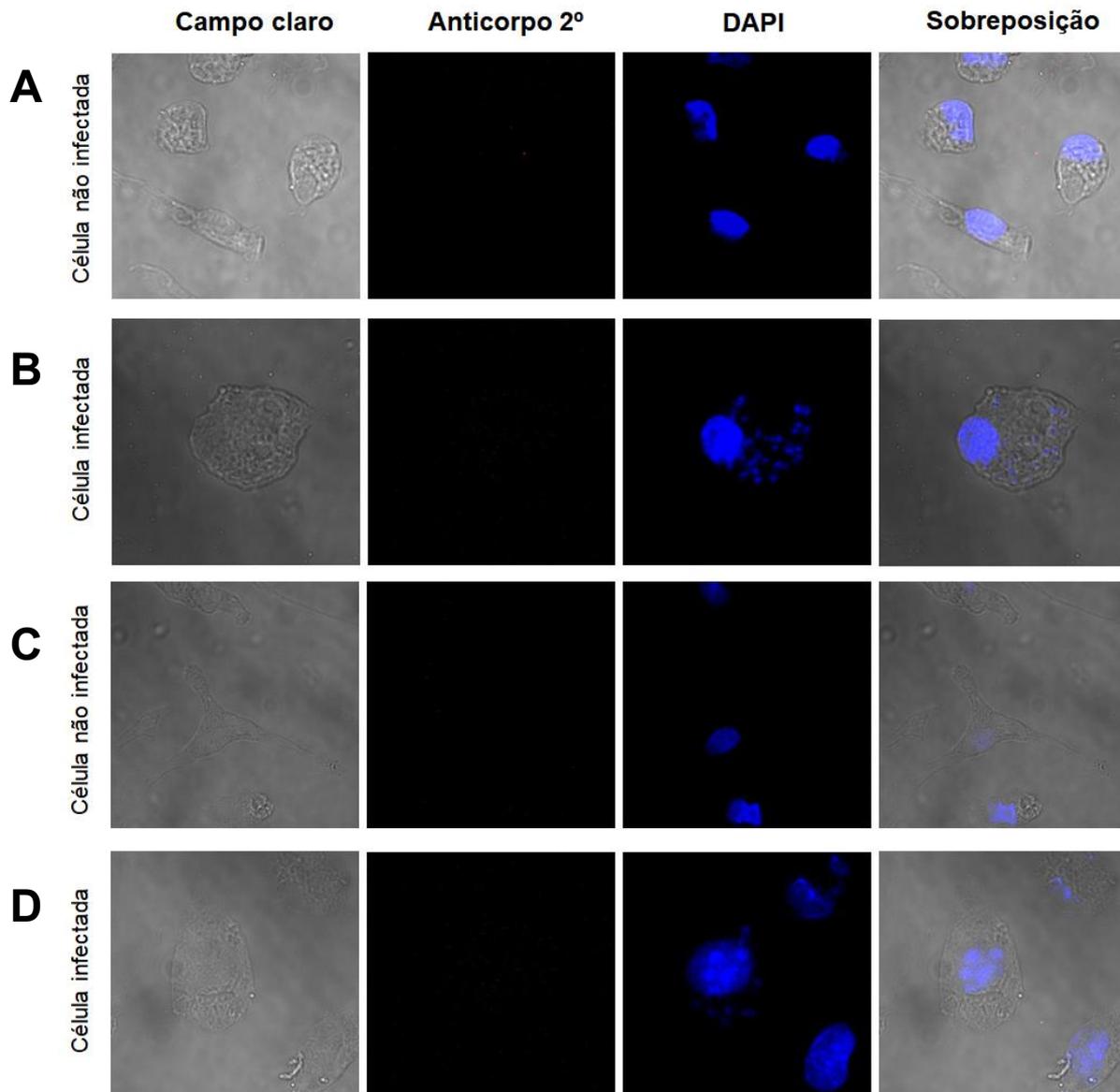


Figura 12: **Controles da imunofluorescência de macrófagos peritoneais murinos infectados por *T. cruzi*, utilizando apenas a marcação com anticorpo secundário.** A fim de certificar de que não haveria interações inespecíficas com o anticorpo secundário, células não infectadas (A e C) e após 24 horas do início da infecção (B e D) foram fixadas e marcadas apenas com anticorpo secundário anti-IgG conjugado com Alexa 594. Constam, também, os campos claros a fim de se observar a delimitação das células. Barra = 10µm.

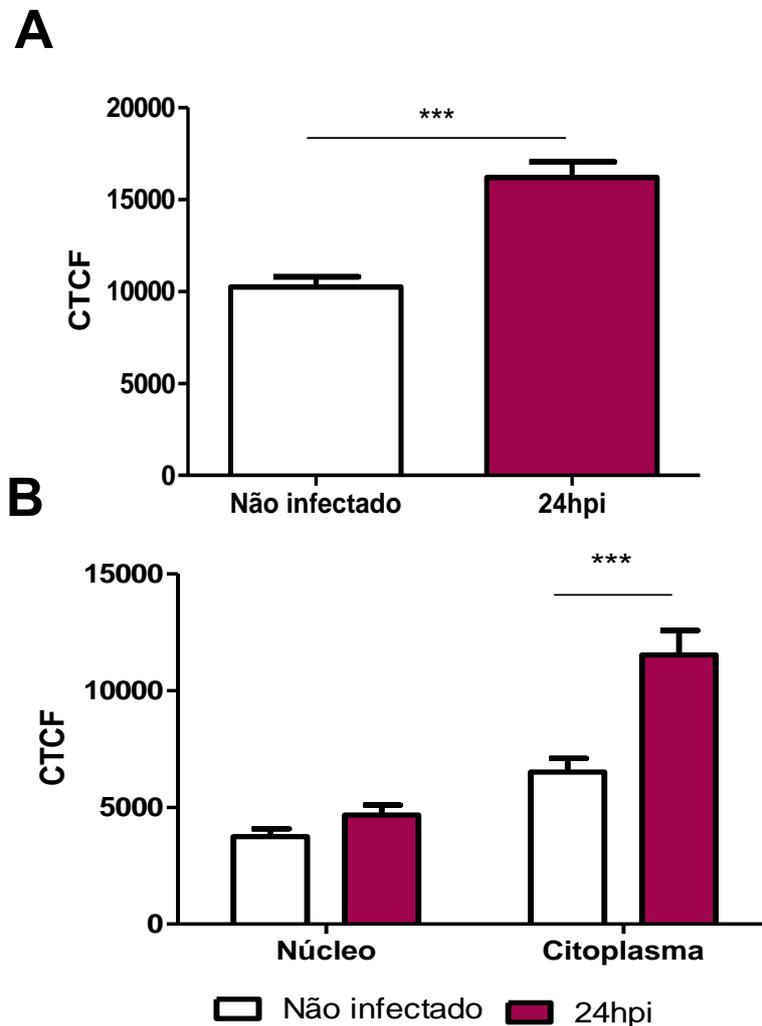


Figura 13: **Comparação do sinal de fluorescência (CTCF) para IL-15 intracelular entre macrófagos não infectados e infectados com *T. cruzi*.** A comparação do sinal de fluorescência foi feita com o auxílio do software ImageJ, que fornece valores para serem utilizados em uma fórmula matemática, que por sua vez, gera índices de CTCF, que foram comparados com aqueles obtidos em células não infectadas. **(A)** Comparação da CTCF entre células não infectadas e células 24 horas após o início da infecção. **(B)** Comparação da CTCF do núcleo e do citoplasma entre células não infectadas e células 24 horas após o início da infecção. O asterisco acima de cada barra contida no gráfico representa uma diferença estatisticamente significativa entre as condições observadas ( $p < 0,001 = ***$ ).

### **4.3 Detecção de IL-15 em sobrenadante e extrato celular de macrófagos durante a infecção por *Leishmania amazonensis***

Pelo fato de que na infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, em contraste com a infecção por *T. cruzi*, ocorrer a replicação do parasito no vacúolo parasitóforo (para uma revisão, veja, Rittig M.G & Bogdan C., 2000), nós nos perguntamos se haveria um padrão de indução e/ou distribuição de IL-15, na infecção por *Leishmania*, diferente daquele padrão que foi observado durante a infecção por *T. cruzi*. Para verificar esse padrão de expressão e distribuição, macrófagos peritoneais murinos foram infectados com a forma promastigota metacíclica de *L. amazonensis*, na proporção de 10:1 parasitos por célula. A determinação das porcentagens de células infectadas mostrou valores de 20,6%; 36,33% e 43% em 24, 48 e 72 horas, respectivamente (figura 14A). O número de amastigotas a cada 100 células infectadas observados foram 230,9; 367,2 e 412 em 24, 48 e 72 horas pós-infecção, respectivamente (figura 14B).

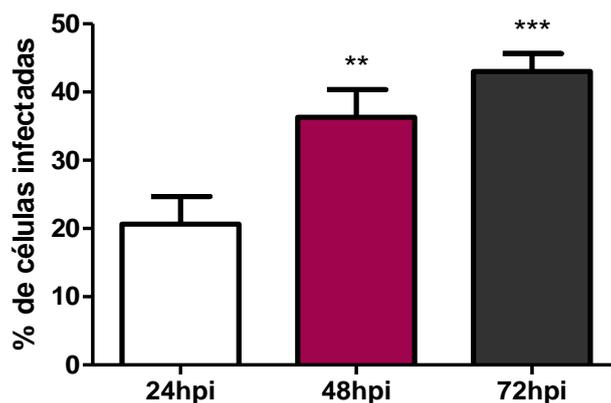
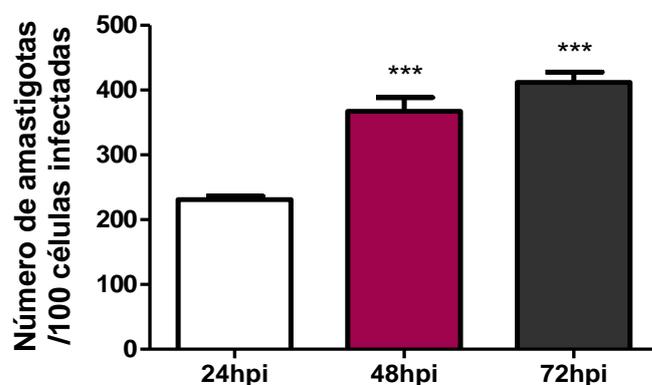
**A****B**

Figura 14: **Porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por 100 células infectadas em macrófagos peritoneais murinos infectados com promastigotas metacíclicas de *Leishmania amazonensis*.** Macrófagos peritoneais murinos foram infectados na proporção de 10:1 promastigotas metacíclicas de *Leishmania amazonensis* por célula. **(A)** Porcentagens de células infectadas em diferentes tempos de infecção. **(B)** Número de amastigotas por 100 células infectadas. No eixo x do gráfico estão indicados os tempos de infecção. O asterisco acima de cada barra contida no gráfico representa uma diferença estatisticamente significativa comparada com o primeiro tempo observado ( $p < 0,01 = **$  e  $p < 0,001 = ***$ ).

O sobrenadante e o extrato celular obtido da cultura de macrófagos infectados por *L. amazonensis* foram analisados por ELISA de captura. Os níveis de IL-15 no sobrenadante desta cultura de células foram indetectáveis. Por outro lado, foi possível observar que em macrófagos infectados por *L. amazonensis* havia a inibição da produção de IL-15 intracelular nas horas iniciais da infecção: uma redução de 2; 1,8 e 1,3 vezes em 6, 24 e 48 horas pós infecção, respectivamente quando comparados com as células não infectadas. Após 72 horas do início da infecção, foi observado que os níveis de IL-15 intracelular chegavam a valores próximos daqueles encontrados em macrófagos não infectados.

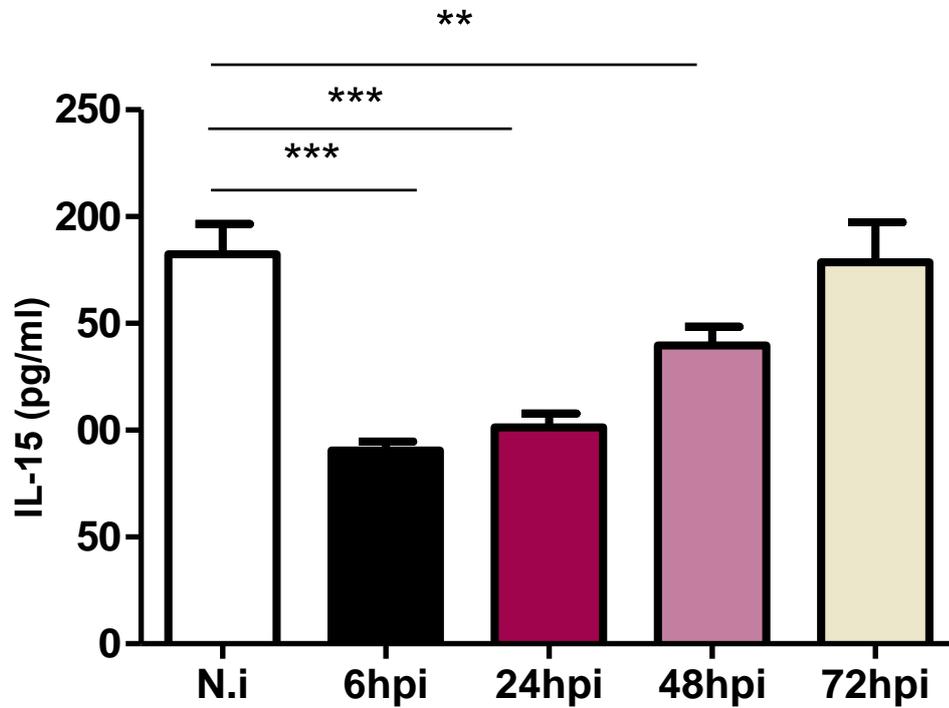


Figura 15: ELISA de extrato celular de macrófagos peritoneais mostrando os níveis de IL-15 em resposta a infecção por *L. amazonensis*.  $1 \times 10^6$  Macrófagos peritoneais murinos/poço foram infectados com a forma promastigota metacíclica de *L. amazonensis* numa razão de 10:1 parasitos por célula. No eixo x do gráfico estão indicados os tempos de infecção e no eixo y do gráfico estão indicadas as concentrações de IL-15. Os tempos de infecção observados foram 6, 24, 48 e 72 horas. O asterisco acima de cada barra contida no gráfico representa uma diferença estatisticamente significativa em comparação com as células não infectadas ( $p < 0,01 = **$  e  $p < 0,001 = ***$ ).

#### **4.4 Imunolocalização de IL-15 em macrófagos murinos infectados por *Leishmania amazonensis***

Para avaliar o padrão de distribuição de IL-15 durante a infecção por *L. amazonensis*, foi realizado o ensaio de imunofluorescência em macrófagos peritoneais murinos infectados por *L. amazonensis* após 24 horas do início da infecção utilizando um anticorpo anti-IL-15 e um anticorpo secundário conjugado com o fluorocromo Alexa 488. Como pode ser observado na figura 16.1, há uma tendência à polarização de IL-15 intracelular para regiões próximas aos amastigotas de *L. amazonensis*. Na figura 16.2, por meio de amplificação da imagem, é possível observar regiões onde há polarização de IL-15 citoplasmática para próximo do parasito. Na figura 17 são mostrados os controles da imunofluorescência de macrófagos peritoneais murinos infectados por *T. cruzi*, nos quais foram utilizados apenas a marcação com anticorpo secundário, a fim de certificar a não existência de marcação inespecífica. De acordo com as figuras 18A e 18B é possível observar que, de modo geral, há uma predominância da localização de IL-15 intracelular na região citoplasmática celular, o que foi observado mesmo em 24hpi, sendo um dos tempo em que foi observada uma redução nos níveis de IL-15.

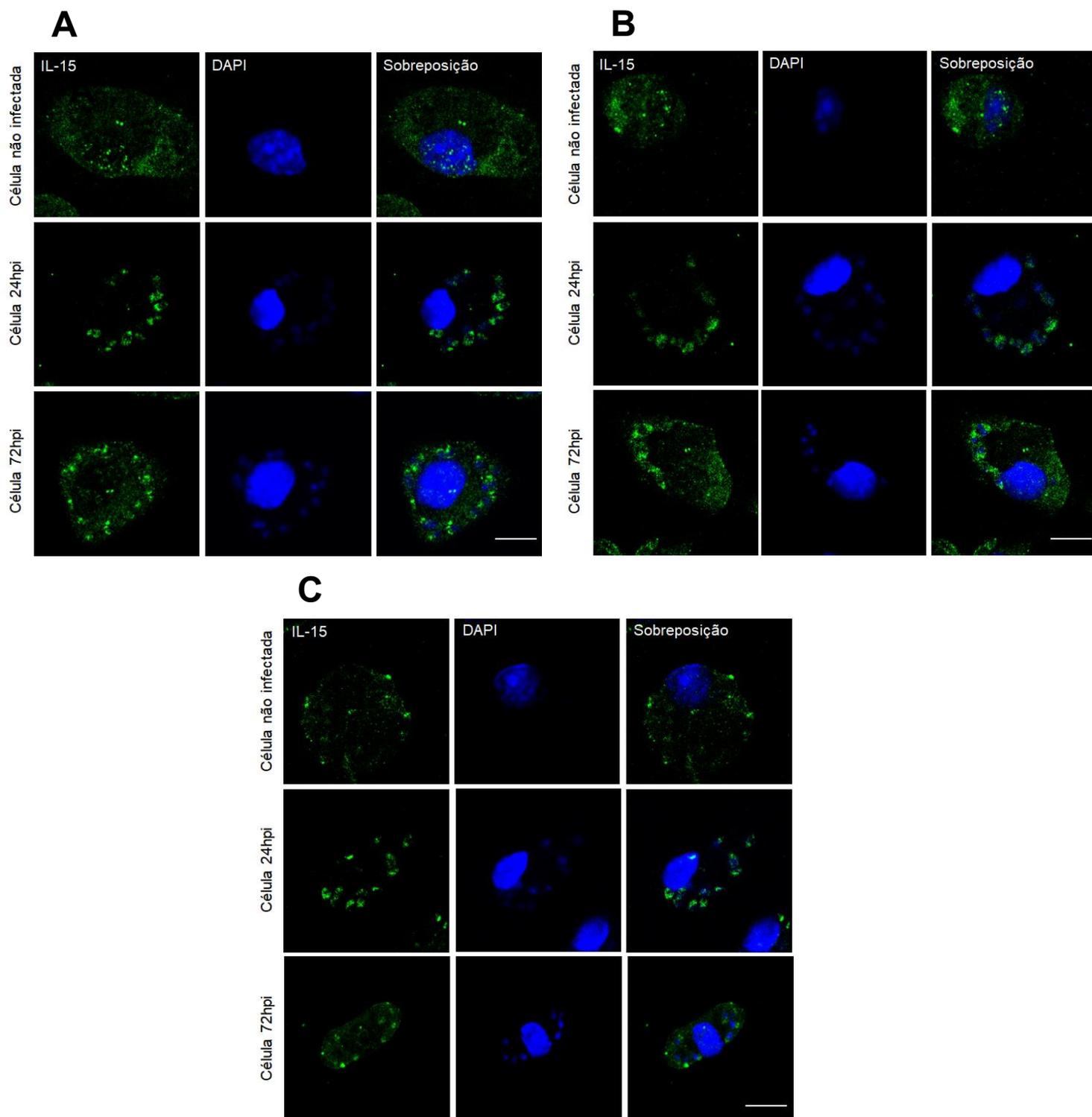


Figura 16.1: **Localização de IL-15 citoplasmática de macrófagos murinos durante a infecção por *Leishmania amazonensis*.** Nas células infectadas (24hpi e 72hpi – parte central e parte inferior, respectivamente, dos blocos A, B e C) é possível observar uma concentração do sinal de fluorescência referente a IL-15 citoplasmática (verde) em torno do parasito, ao contrário do que ocorre nas células não infectadas (parte superior dos blocos A, B e C), nas quais IL-15 se encontra distribuída de forma difusa. O DAPI (azul) indica a localização de material genético tanto do macrófago quando do parasito. Barra = 10µm.

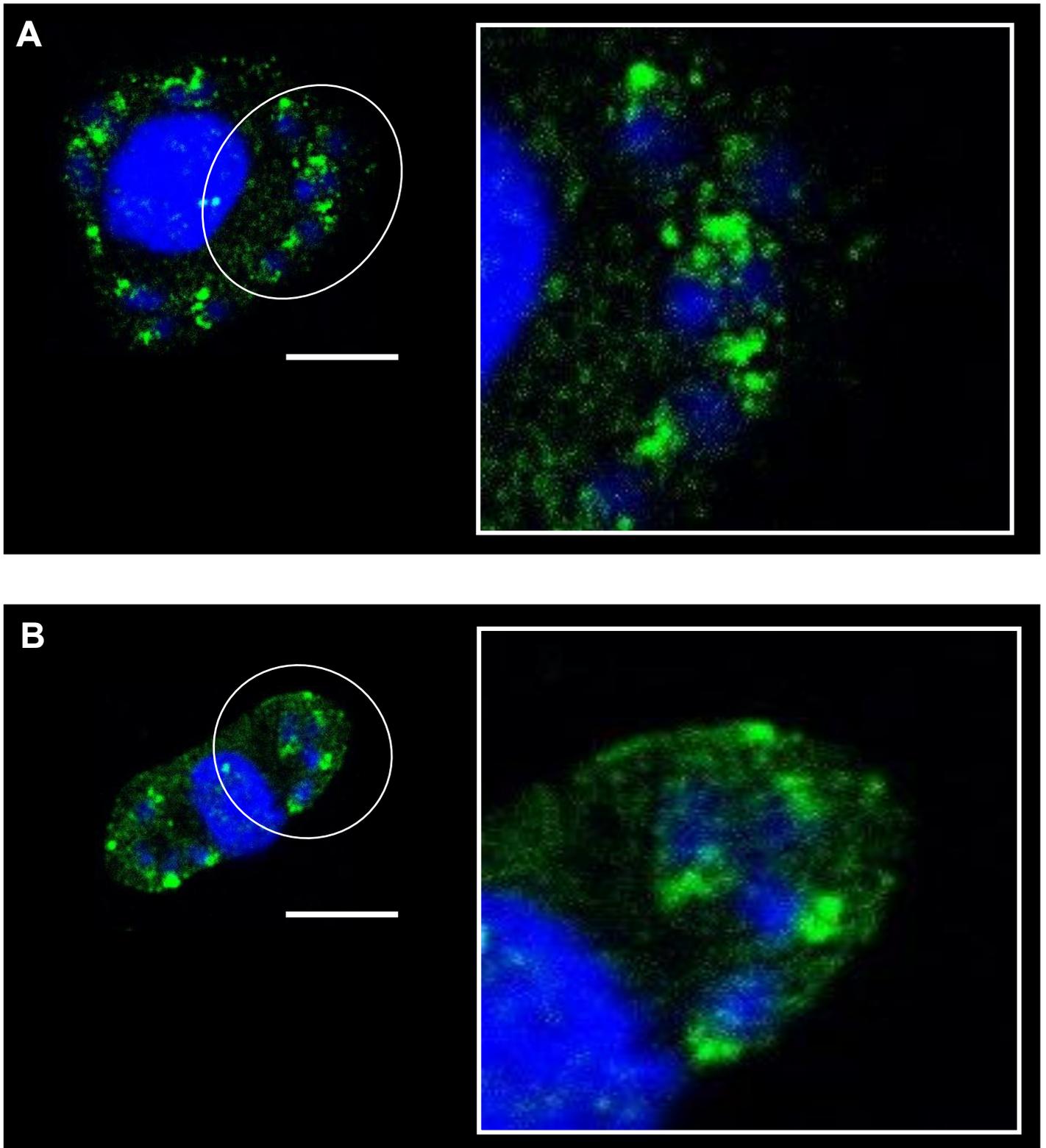


Figura 16.2: **Localização de IL-15 citoplasmática durante a infecção de macrófagos murinos por *Leishmania amazonensis* (com amplificação da imagem).** Nas células infectadas (A e B) é possível observar uma tendência à polarização de IL-15 (verde) em regiões próximas ao parasito (região destaca pelo círculo). O DAPI (azul) indica a localização de material genético tanto do macrófago quanto do parasito. Barra = 10 $\mu$ m.

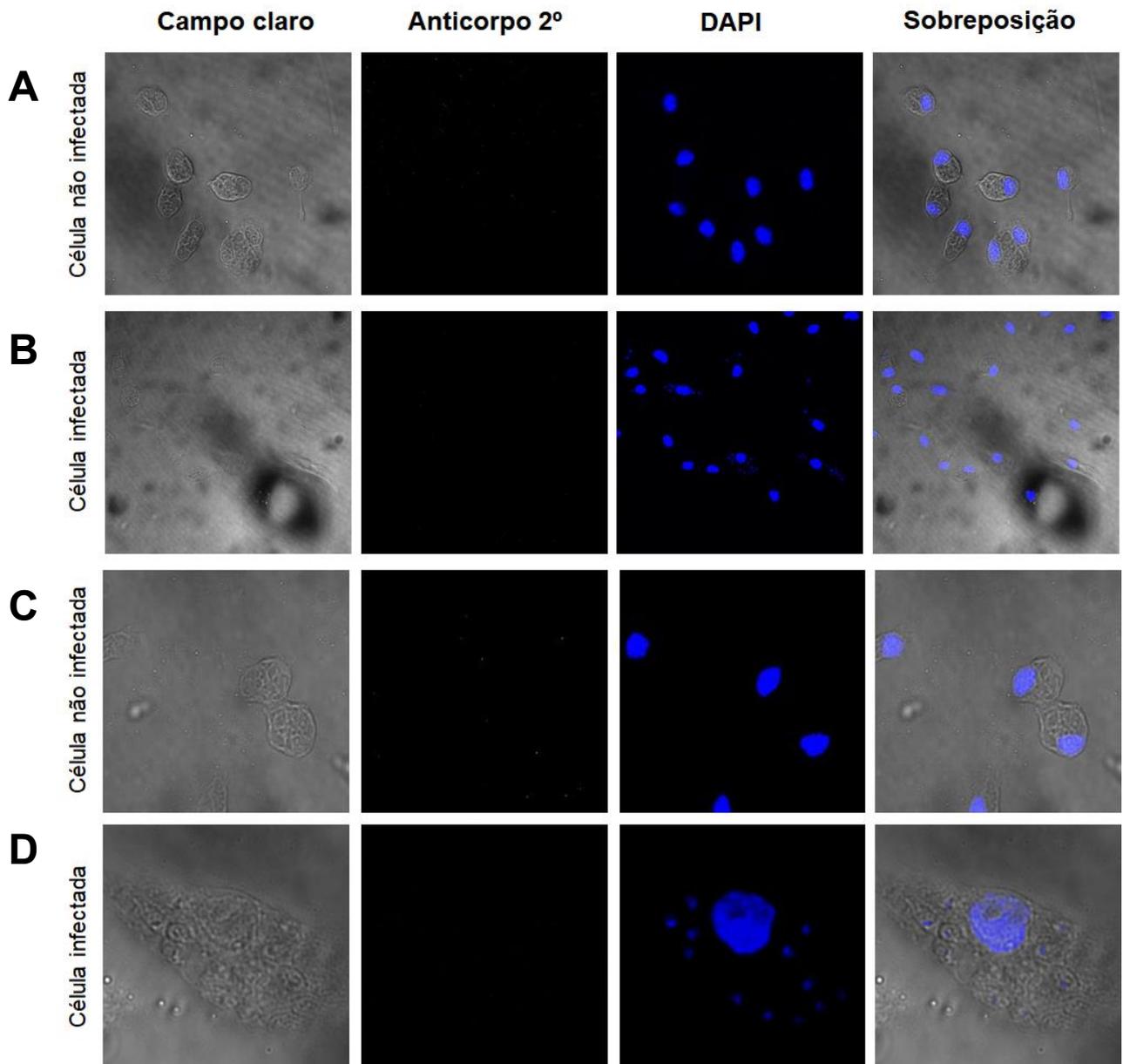


Figura 17: **Controles da imunofluorescência de macrófagos peritoneais murinos infectados por *L. amazonensis* utilizando apenas a marcação com anticorpo secundário.** A fim de certificar de que não haveria interações inespecíficas com o anticorpo secundário, células não infectadas ( A e C) e após 72 horas do início da infecção (B e D) foram fixadas e marcadas apenas com anticorpo secundário anti-IgG conjugado com Alexa 488. Constam, também, os campos claros a fim de se observar a delimitação das células. Barra = 10µm.

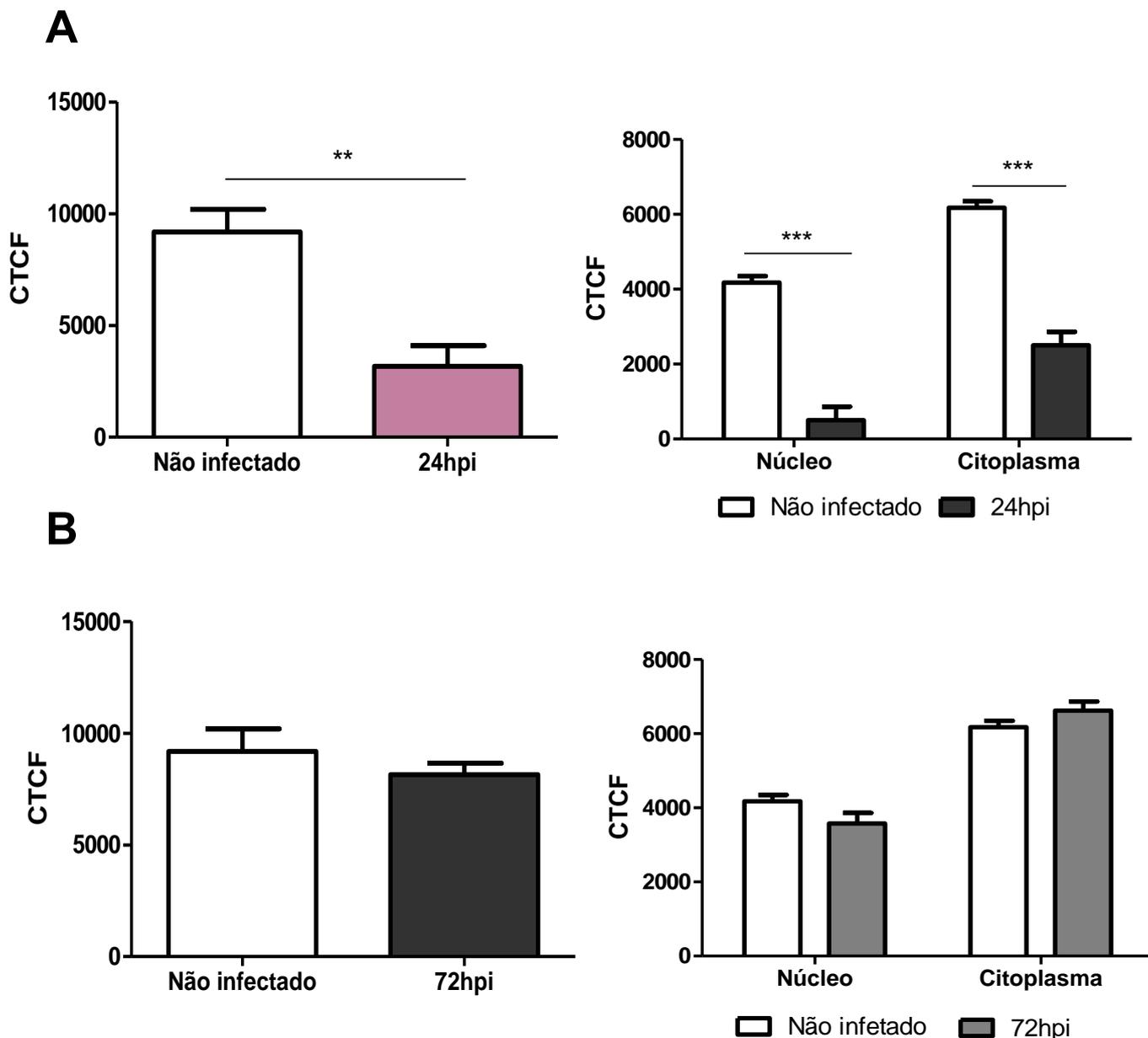


Figura 18: **Comparação do sinal de fluorescência (CTCF) para IL-15 intracelular entre macrófagos não infectados e infectados com *L. amazonensis*.** A comparação do sinal de fluorescência foi feita com o auxílio do software ImageJ, que fornece valores para serem utilizados em uma fórmula matemática, que por sua vez, gera índices de CTCF, que foram comparados com aqueles obtidos em células não infectadas (**A, parte esquerda**) Comparação da CTCF entre células não infectadas e células 24 horas após o início da infecção. (**A, parte direita**) Comparação da CTCF do núcleo e do citoplasma entre células não infectadas e células 24 horas após o início da infecção. (**B, parte esquerda**) Comparação da CTCF entre células não infectadas e células 72 horas após o início da infecção. (**B, parte direita**) Comparação da CTCF do núcleo e do citoplasma entre células não infectadas e células 72 horas após o início da infecção. O asterisco acima de cada barra contida no gráfico representa uma diferença estatisticamente significativa entre as condições observadas ( $p < 0,01 = **$  e  $p < 0,001 = ***$ ).

#### **4.5 Detecção de IL-15 em sobrenadante e extrato celular de cultura de células L6, LLCMK2 e H9C2 infectadas com *T. cruzi***

De acordo com a literatura, IL-15 tem diversas particularidades que a diferencia das outras citocinas da resposta inflamatória. Uma das características peculiares de IL-15 é que esta é produzida por outras células e tecidos além do sistema imune (Grabstein *et al.*, 1994). Assim, o padrão de expressão de IL-15 foi analisado em várias linhagens celulares infectadas por *T. cruzi*, como por exemplo, em células L6, uma linhagem de mioblasto isolada do musculo esquelético de ratos, por apresentarem características de células musculares diferenciadas como a alta expressão da proteína GLUT4 (Wang Q. *et al.*, 1999); em células LLCMK2, uma linhagem de célula epitelial originada de tecido renal de macaco (Hull R. N. *et al.*, 1956; Evans V. J. *et al.*, 1959); e em células H9C2, que são uma linhagem de cardiomiócitos multinucleados, sem atividade contrátil provindos do tecido de ventrículos de ratos BDIX, possuindo diversos marcadores cardíacos (Kimes BW *et al.*, 1976; Peter *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2010). Estas células foram plaqueadas e infectadas na proporção de 5:1 tripomastigotas por célula. Os índices de infecção e número de amastigotas por 100 células infectadas foram determinados. Para a infecção das células L6, as porcentagens de células infectadas apresentadas foram de 34%, 44% e 82,66% em 24, 48 e 72 horas pós infecção, respectivamente. O número de amastigotas a cada 100 células infectadas observado foi de 455,4; 1221,4 e 1360,1 em 24, 48 e 72 horas após o início da infecção, respectivamente (figura 19 A e B). Para a infecção das células LLCMK2, as porcentagens de células infectadas apresentadas foram de 28,66%; 59% e 67% em 24, 48 e 72 horas pós infecção, respectivamente. O número de amastigotas a cada 100 células infectadas observado foi de 581,1; 1048 e 1660,2 em 24, 48 e 72 horas após o início da infecção, respectivamente (figura 20 A e B). Para a infecção das células H9C2, as porcentagens de células infectadas apresentadas foram de 38%, 72% e 85,33% em 24, 48 e 72 horas pós infecção, respectivamente quando comparados com o tempo de 24 após o início da infecção. O número de amastigotas a cada 100 células infectadas observado foi de 331,4; 583,8 e 710,9 em 24, 48 e 72 horas pós-infecção, respectivamente (figura 21 A e B).

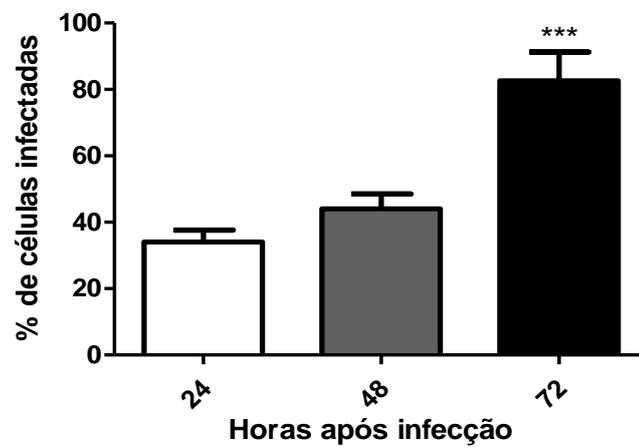
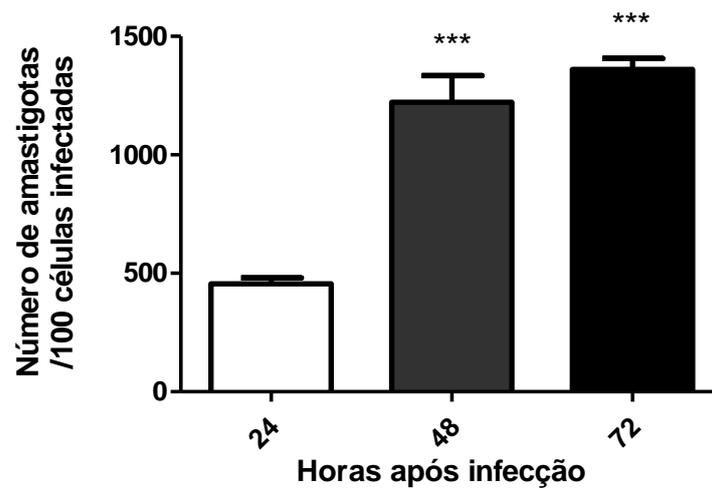
**A****B**

Figura 19: **Porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por 100 células infectadas em células L6 infectadas com *T. cruzi*.** Células L6 foram infectados na proporção de 5:1 parasitos por célula com tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*. **(A)** Porcentagens de células infectadas em diferentes tempos de infecção. **(B)** Número de amastigotas por 100 células infectadas. No eixo x do gráfico estão indicados os tempos de infecção. O asterisco acima de cada barra contida no gráfico representa uma diferença estatisticamente significativa comparada com o primeiro tempo observado ( $p < 0,001 = ***$ ).

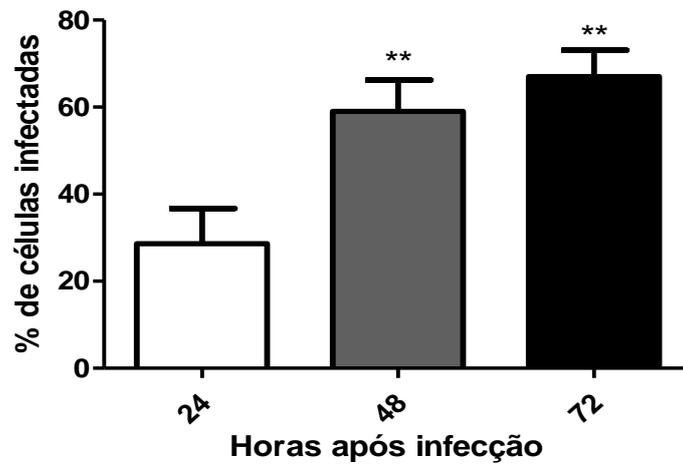
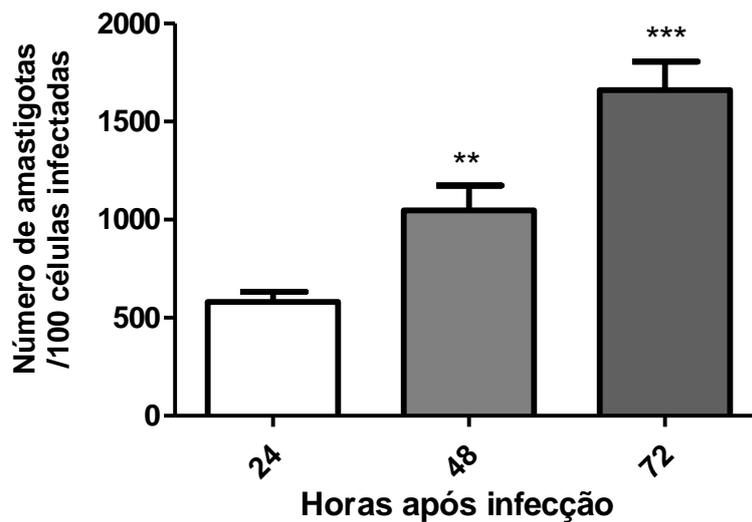
**A****B**

Figura 20: **Porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por 100 células infectadas em células LLCMK2 infectadas por *T. cruzi*.** Células LLCMK2 foram infectados na proporção de 5:1 parasitos por célula com tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*. **(A)** Porcentagens de células infectadas em diferentes tempos de infecção. **(B)** Número de amastigotas por 100 células infectadas. No eixo x do gráfico estão indicados os tempos de infecção. O asterisco acima de cada barra contida no gráfico representa uma diferença estatisticamente significativa comparada com o primeiro tempo observado ( $p < 0,01 = **$  e  $p < 0,001 = ***$ ).

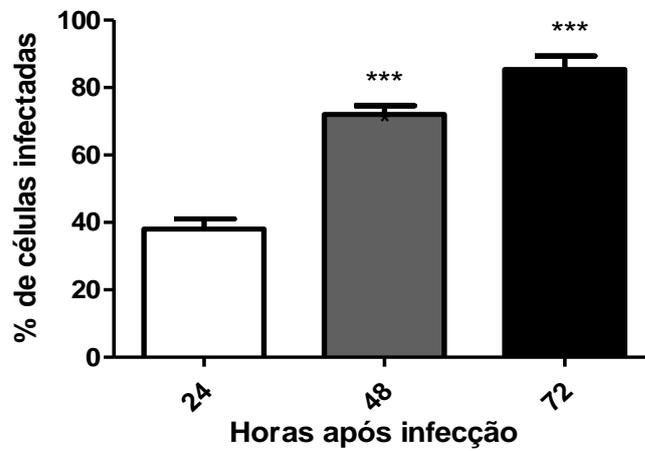
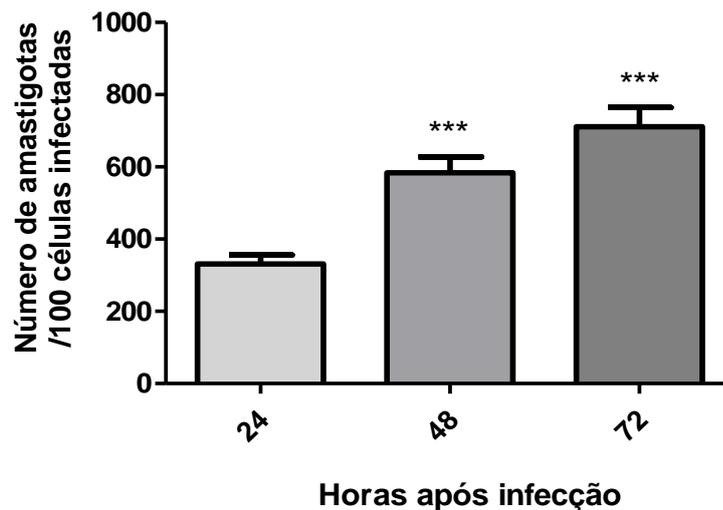
**A****B**

Figura 21: **Porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por 100 células infectadas em células H9C2 infectadas com *T. cruzi*.** Células H9C2 foram infectados na proporção de 5:1 parasitos por célula com tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*. **(A)** Porcentagens de células infectadas em diferentes tempos de infecção. **(B)** Número de amastigotas por 100 células infectadas. No eixo x do gráfico estão indicados os tempos de infecção. O asterisco acima de cada barra contida no gráfico representa uma diferença estatisticamente significativa comparada com o primeiro tempo observado ( $p < 0,001 = ***$ ).

Assim, o sobrenadante e o extrato celular destas culturas de células foram analisados por ELISA de captura. Não foi possível detectar IL-15 nos sobrenadantes das culturas de células L6 ou LLCMK2 infectadas por *T. cruzi*. Por outro lado, amostras de extrato celular da cultura de células L6 mostraram um aumento da produção de IL-15 intracelular de 2 vezes em 24 horas pós infecção quando comparados com as células não infectadas (figura 22). A amostra do extrato celular da cultura de células LLCMK2 apresentou um aumento na produção de IL-15 intracelular de 1,8; 1,69; 1,4 e 1,5 vezes em 24, 48, 72 e 96 horas pós infecção, respectivamente quando comparadas com as células não infectadas (figura 23). A amostra do extrato celular da cultura de células H9C2 apresentou um aumento na produção de IL-15 intracelular de 2,2; 3,12 e 3,28 vezes em 48, 72 e 96 horas pós infecção, respectivamente quando comparadas com as células não infectadas (figura 24). Foi possível detectar IL-15 secretada no sobrenadante da cultura de células H9C2 infectadas por *T. cruzi* sendo que os níveis dessa citocina aumentaram 6,2; 6; 12,1; 13,3 e 8,9 vezes em 6, 24, 48, 72 e 96 horas após o início da infecção (figura 25).

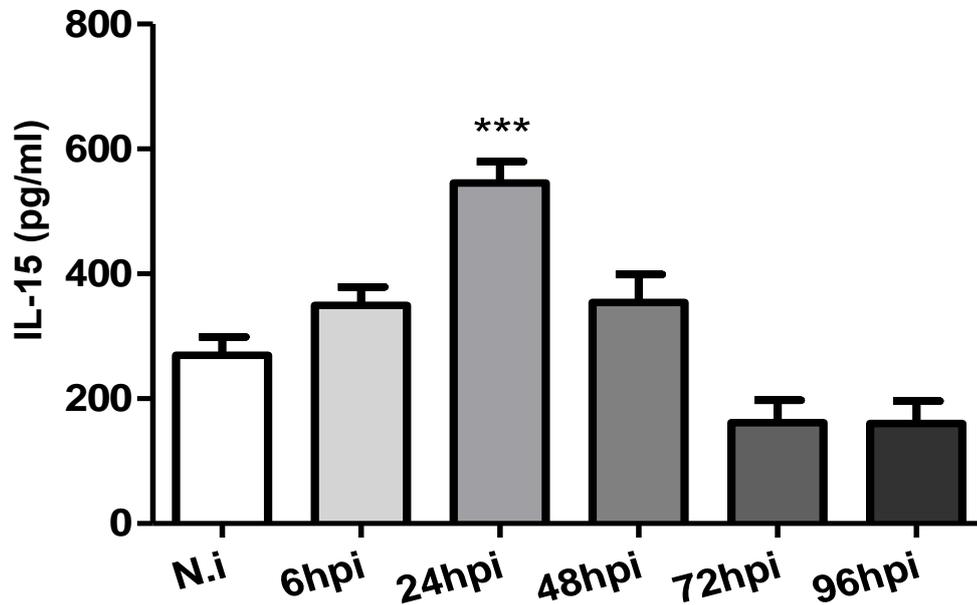


Figura 22: ELISA do extrato celular de células L6 mostrando os níveis de IL-15 em resposta a infecção por *T. cruzi*.  $5 \times 10^5$  células/poço foram infectadas com a forma tripomastigota de *T. cruzi* numa razão de 5:1 parasitos por célula. No eixo x do gráfico estão indicados os tempos de infecção e no eixo y do gráfico estão indicadas as concentrações de IL-15. Os tempos de infecção observados foram 6, 24, 48, 72 e 96 horas. O asterisco acima de cada barra contida no gráfico representa uma diferença estatisticamente significativa em comparação com as células não infectadas ( $p < 0,001 = ***$ ).

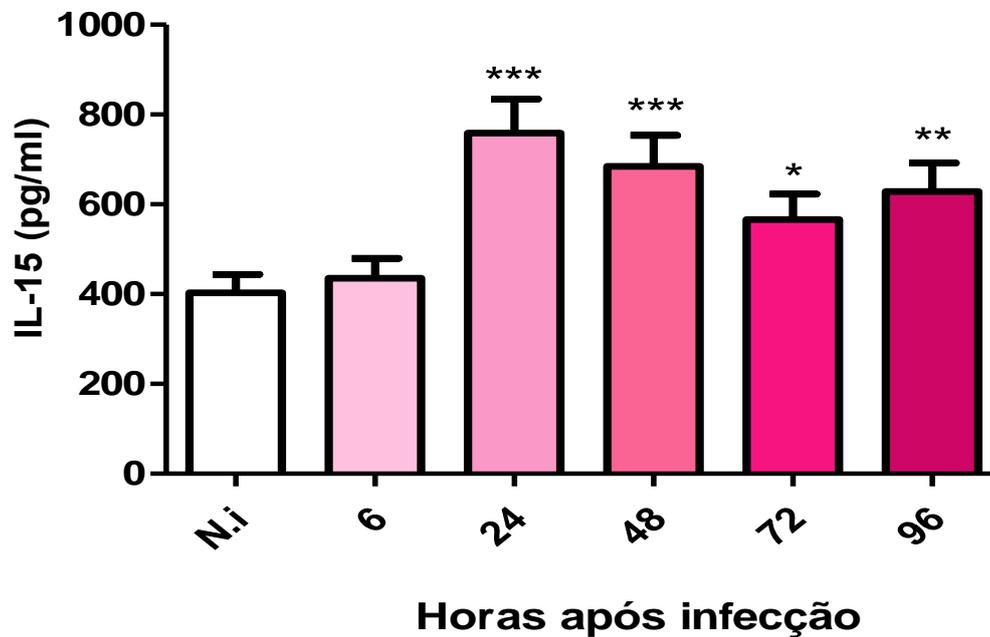


Figura 23: ELISA do extrato celular de células LLCMK2 mostrando os níveis de IL-15 em resposta a infecção por *T. cruzi*.  $5 \times 10^5$  célula /poço foram infectados com a forma tripomastigota de *T. cruzi* numa razão de 5:1 parasitos por célula. No eixo x do gráfico estão indicados os tempos de infecção e no eixo y do gráfico estão indicadas as concentrações de IL-15. Os tempos de infecção observados foram 6, 24, 48, 72 e 96 horas. O asterisco acima de cada barra contida no gráfico representa uma diferença estatisticamente significativa em comparação com as células não infectadas ( $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$  e  $p < 0,001 = ***$ ).

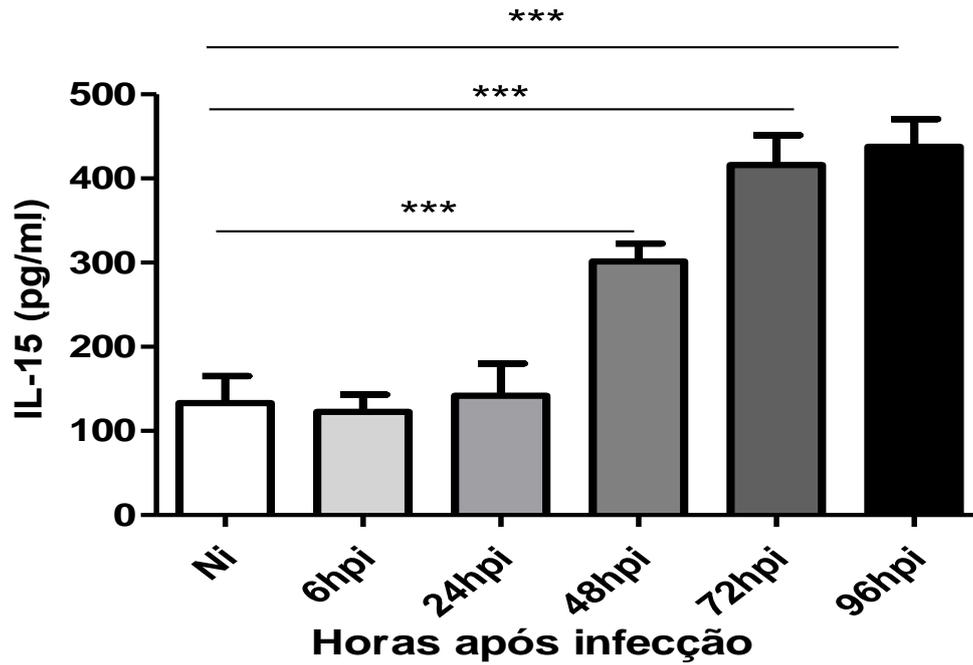


Figura 24: ELISA do extrato celular de células H9C2 mostrando os níveis de IL-15 em resposta a infecção por *T. cruzi*.  $5 \times 10^5$  células /poço foram infectadas com a forma tripomastigota de *T. cruzi* numa razão de 5:1 parasitos por célula. No eixo x do gráfico estão indicados os tempos de infecção e no eixo y do gráfico estão indicadas as concentrações de IL-15. Os tempos de infecção observados foram 6, 24, 48, 72 e 96 horas. O asterisco acima de cada barra contida no gráfico representa uma diferença estatisticamente significativa em comparação com as células não infectadas ( $p < 0,001 = ***$ ).

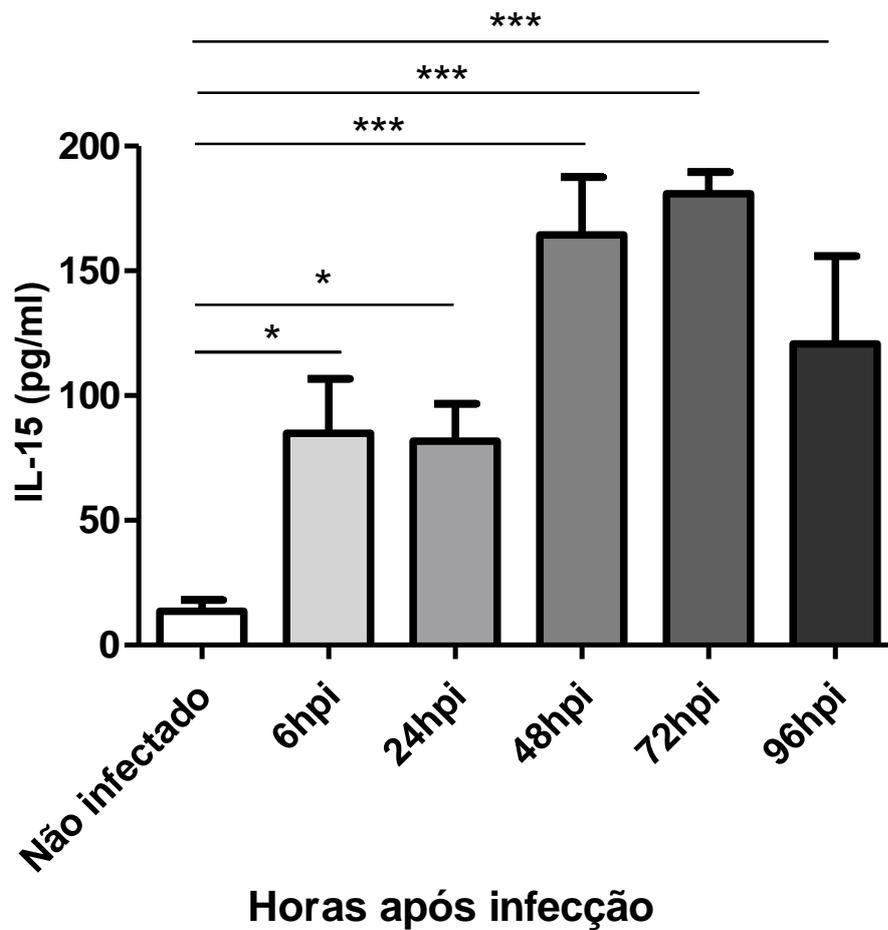


Figura 25: ELISA do sobrenadante de cultura de células H9C2 mostrando os níveis de IL-15 em resposta a infecção por *T. cruzi*.  $5 \times 10^5$  células /poço foram infectadas com a forma tripomastigota de *T. cruzi* numa razão de 5:1 parasitos por célula. No eixo x do gráfico estão indicados os tempos de infecção e no eixo y do gráfico estão indicadas as concentrações de IL-15. Os tempos de infecção observados foram 6, 24, 48, 72 e 96 horas. O asterisco acima de cada barra contida no gráfico representa uma diferença estatisticamente significativa em comparação com as células não infectadas ( $p < 0,05 = *$  e  $p < 0,0001 = ***$ ).

#### 4.6 Imunolocalização de IL-15 em células L6 infectadas por *T. cruzi*

Em seguida, nos perguntamos se o padrão de distribuição de IL-15 observado em macrófagos murinos infectados por *T. cruzi* poderia, também, ser observado em modelo de infecção de células não imunes e não fagocíticas. Para responder esta pergunta, realizamos o ensaio de imunofluorescência em células L6 infectadas por *T. cruzi* e observamos que, em células não infectadas, IL-15 se encontra bem difusa entre núcleo de citoplasma, porém, quando esta célula é submetida a infecção, a proteína, que tem sua produção aumentada, se concentra no citoplasma, se concentrando em maior intensidade com as formas amastigotas de *T. cruzi*. Esses resultados podem ser observados na figura 26.1. Na figura 26.2, por meio de amplificação da imagem, é possível observar regiões onde há polarização de IL-15 citoplasmática para próximo do parasito. Na figura 27 são mostrados os controles da imunofluorescência de macrófagos peritoneais murinos infectados por *T. cruzi*, nos quais foram utilizados apenas a marcação com anticorpo secundário, a fim de certificar a não existência de marcação inespecífica. Para quantificar o resultado da imunofluorescência, nós determinamos a CTCF das células infectadas e não infectadas, podendo, desta forma, constatar um maior sinal de fluorescência para IL-15 intracelular nas células infectadas quando comparadas com as células não infectadas. Esse resultado pode ser observado na figura 28A. Em seguida nos perguntamos se havia diferença da quantidade de IL-15 intracelular na comparação entre a porção nuclear e citoplasmática. Para isso a CTCF das porções nuclear e citoplasmática foi determinada tanto para células infectadas quanto para células não infectadas. Esses resultados mostraram que a quantidade de IL-15 intracelular na porção nuclear em ambas as situações não varia. Por outro lado, houve aumento significativo da CTCF na porção citoplasmática das células infectadas quando comparadas com as células não infectadas, mostrando que a proteína que era produzida devido a infecção, se concentrava no citoplasma da célula. Esses resultados podem ser observados na figura 28B.

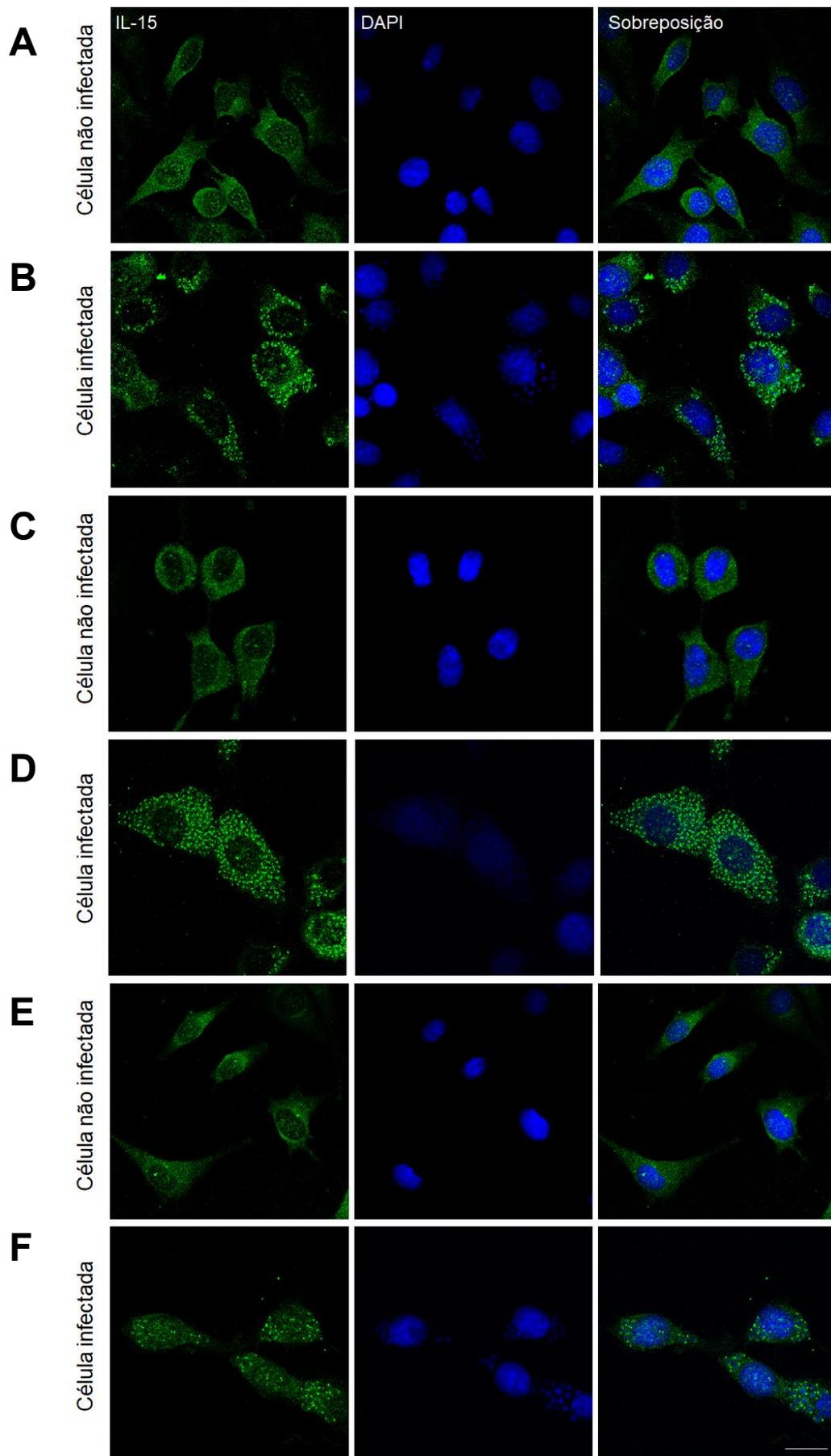


Figura 26.1: **Localização de IL-15 citoplasmática durante a infecção de células L6 por *T. cruzi*.** Nas células infectadas (24hpi) (B, D e F) é possível observar a polarização de IL-15 (verde) para próximo do parasito, em volta dos quais há maior intensidade do sinal de fluorescência para a citocina, se encontrando predominantemente na região do citoplasma da célula, ao contrário das células não infectadas (A, C e E), nas quais a IL-15 citoplasmática se encontra distribuída de forma difusa. O DAPI (azul) indica a localização de material genético tanto do macrófago quando do parasito. Barra = 10µm.

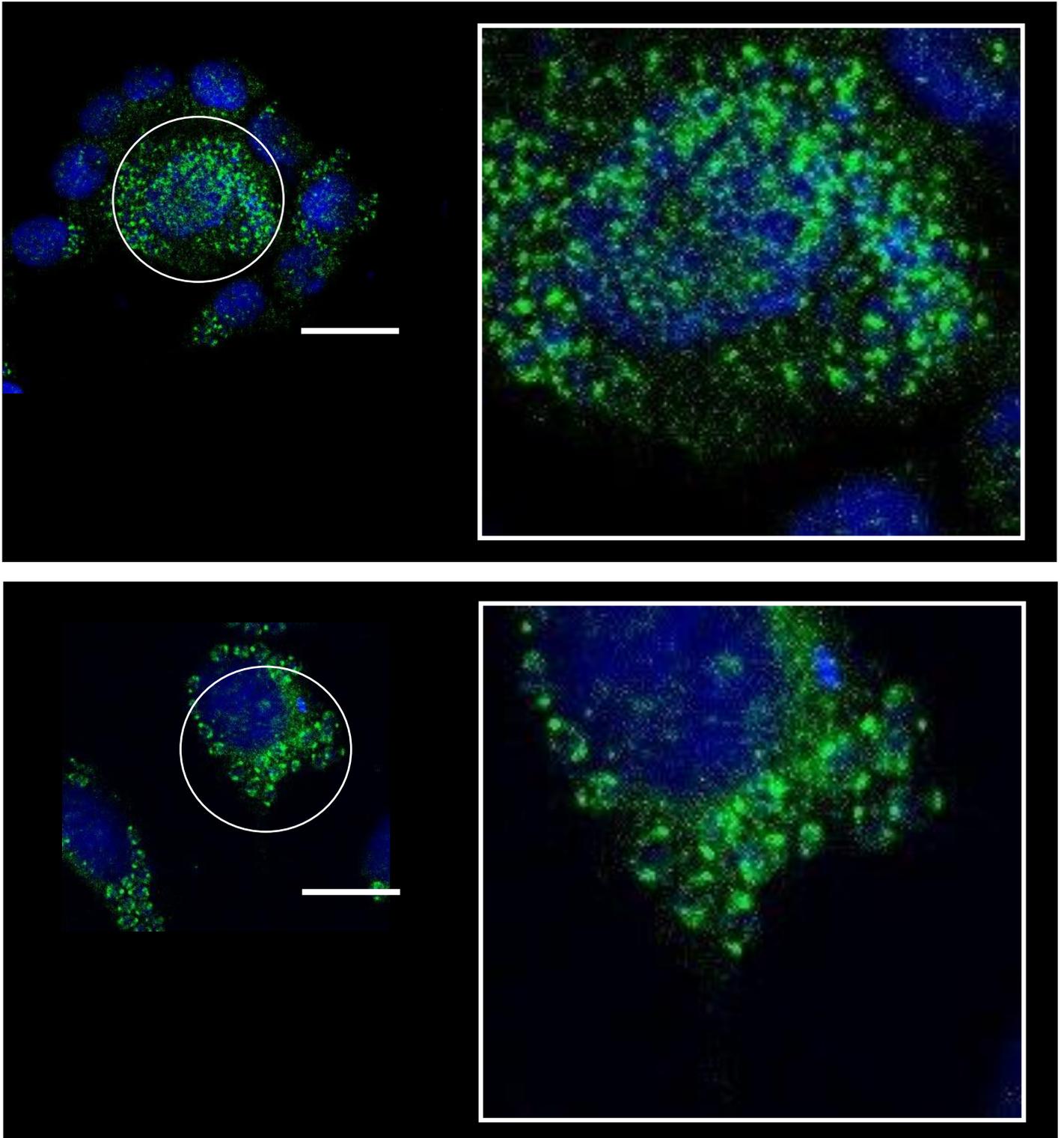


Figura 26.2: **Localização de IL-15 citoplasmática durante a infecção de células L6 por *T. cruzi* (com amplificação da imagem)**. Nas células infectadas (A e B) é possível observar uma tendência à polarização de IL-15 (verde) em regiões próximas ao parasito (região destaca pelo círculo). O DAPI (azul) indica a localização de material genético tanto do macrófago quando do parasito. Barra = 10 $\mu$ m.

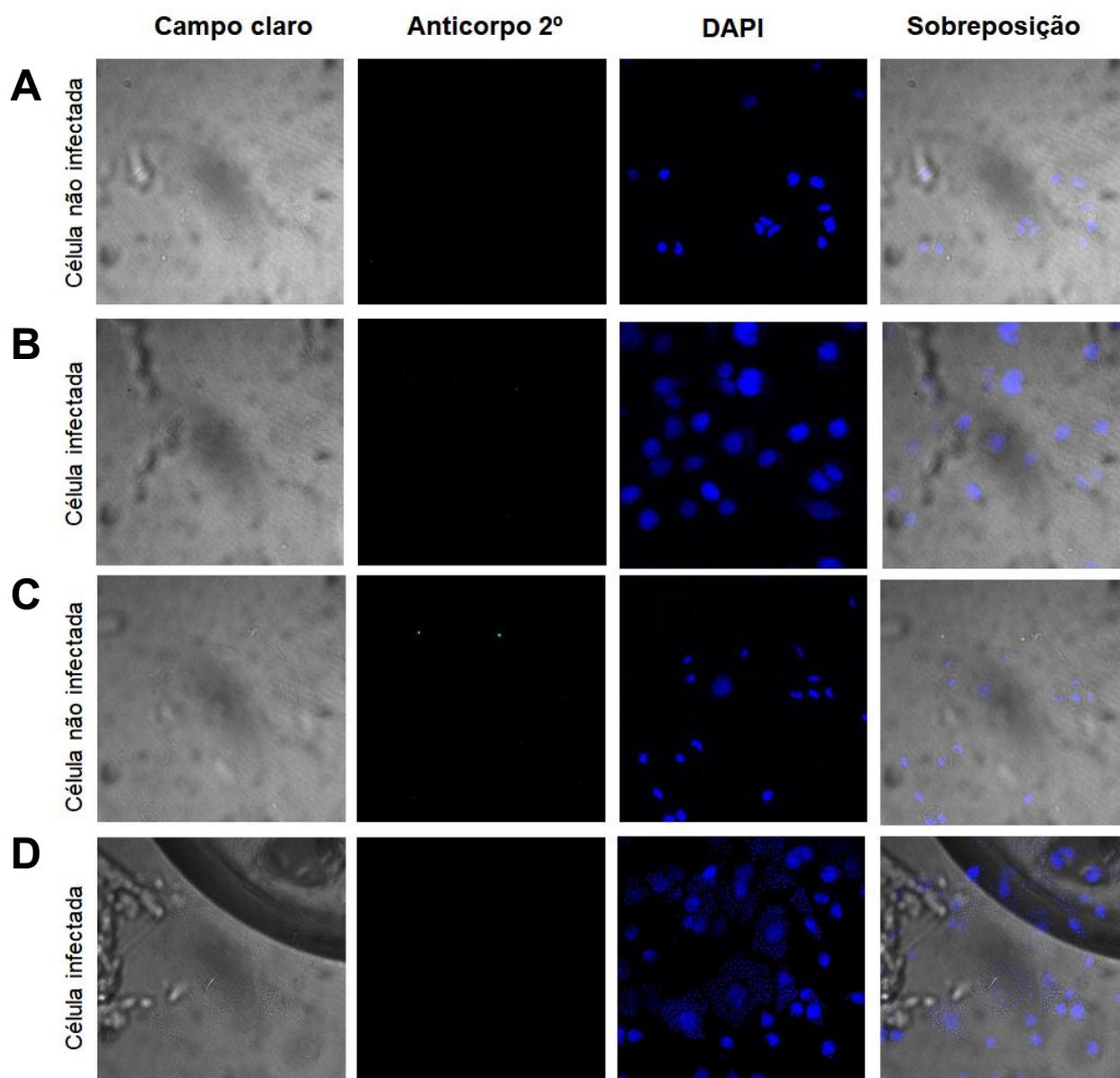


Figura 27: **Controles da munofluorescência de células L6 infectadas por *T. cruzi* utilizando apenas a marcação com anticorpo secundário.** A fim de certificar de que não haveria interações inespecíficas com o anticorpo secundário, células não infectadas (A e C) e após 24 horas do início da infecção (B e D) foram fixadas e marcadas apenas com anticorpo secundário anti-IgG conjugado com Alexa 488. Constam, também, o campo claro a fim de se observar a delimitação das células. Barra = 10µm.

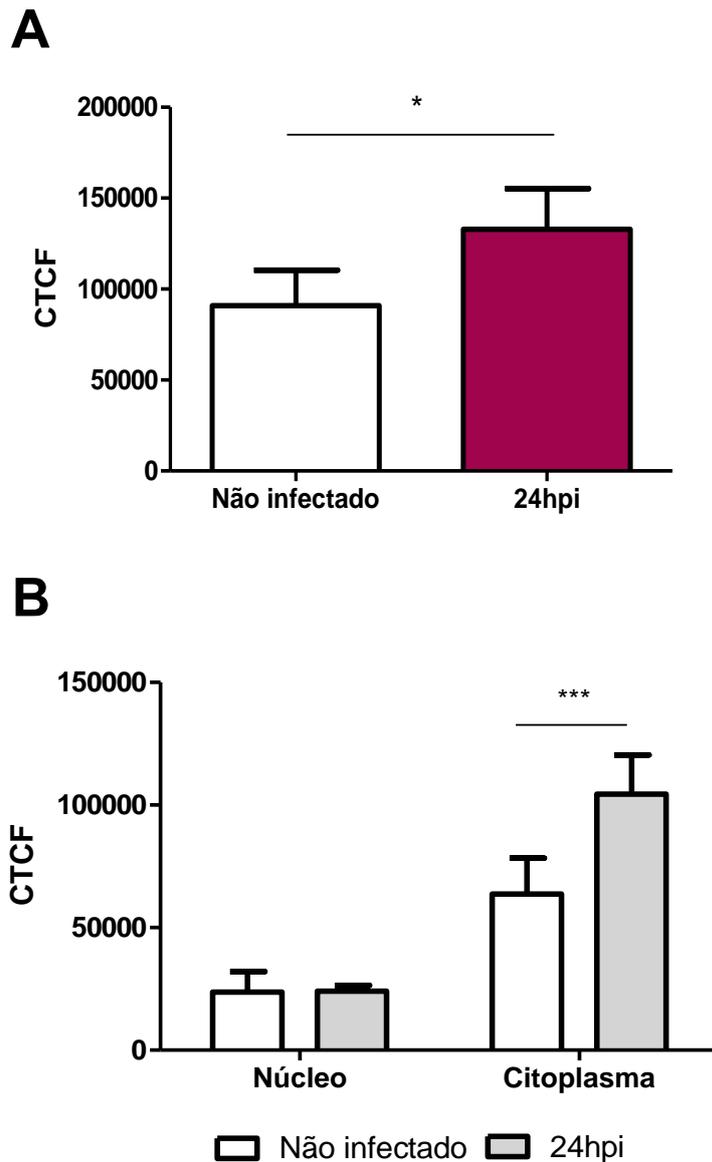


Figura 28: **Comparação do sinal de fluorescência (CTCF) para IL-15 intracelular entre macrófagos não infectados e infectados com *T. cruzi*.** A comparação do sinal de fluorescência foi feita com o auxílio do software ImageJ, que fornece valores para serem utilizados em uma fórmula matemática, que por sua vez, gera índices de CTCF, que foram comparados com aqueles obtidos em células não infectadas **(A)** Comparação da CTCF entre células não infectadas e células 24 horas após o início da infecção. **(B)** Comparação da CTCF do núcleo e do citoplasma entre células não infectadas e células 24 horas após o início da infecção. O asterisco acima de cada barra contida no gráfico representa uma diferença estatisticamente significativa entre as condições observadas ( $p < 0,01 = **$  e  $p < 0,001 = ***$ ).

#### **4.7 Infecção de macrófagos peritoneais murinos previamente estimulados com IL-15 com tripomastigotas de *T. cruzi***

Assim, para verificar os efeitos biológicos da IL-15 secretada e testar se há diferença nos papéis das duas isoformas de IL-15 durante a infecção por *T. cruzi*, macrófagos murinos foram estimulados com IL-15 recombinante (10ng/mL) por 24 horas e logo após esse tempo foram infectados com *T. cruzi* na proporção de 5 parasitos por célula. As lâminas referentes a diferentes tempos de infecção foram coradas e os índices de infecção foram observados. De acordo com a figura 29A e 29B o estímulo com IL-15 recombinante induz um aumento na atividade tripanocida por parte dos macrófagos em 24 e 48 horas após início da infecção, observado pela redução de 32% e 41,5% na porcentagem de células infectadas, respectivamente. Houve redução no número de amastigota a cada 100 células infectadas, onde foi observada uma de redução de 37,86% em 48 horas pós-infecção. Esta atividade tripanocida foi mantida quando o co-estímulo foi feito com IFN- $\gamma$ (100ng/ml), apresentando reduções significativas em todos os tempos observados.

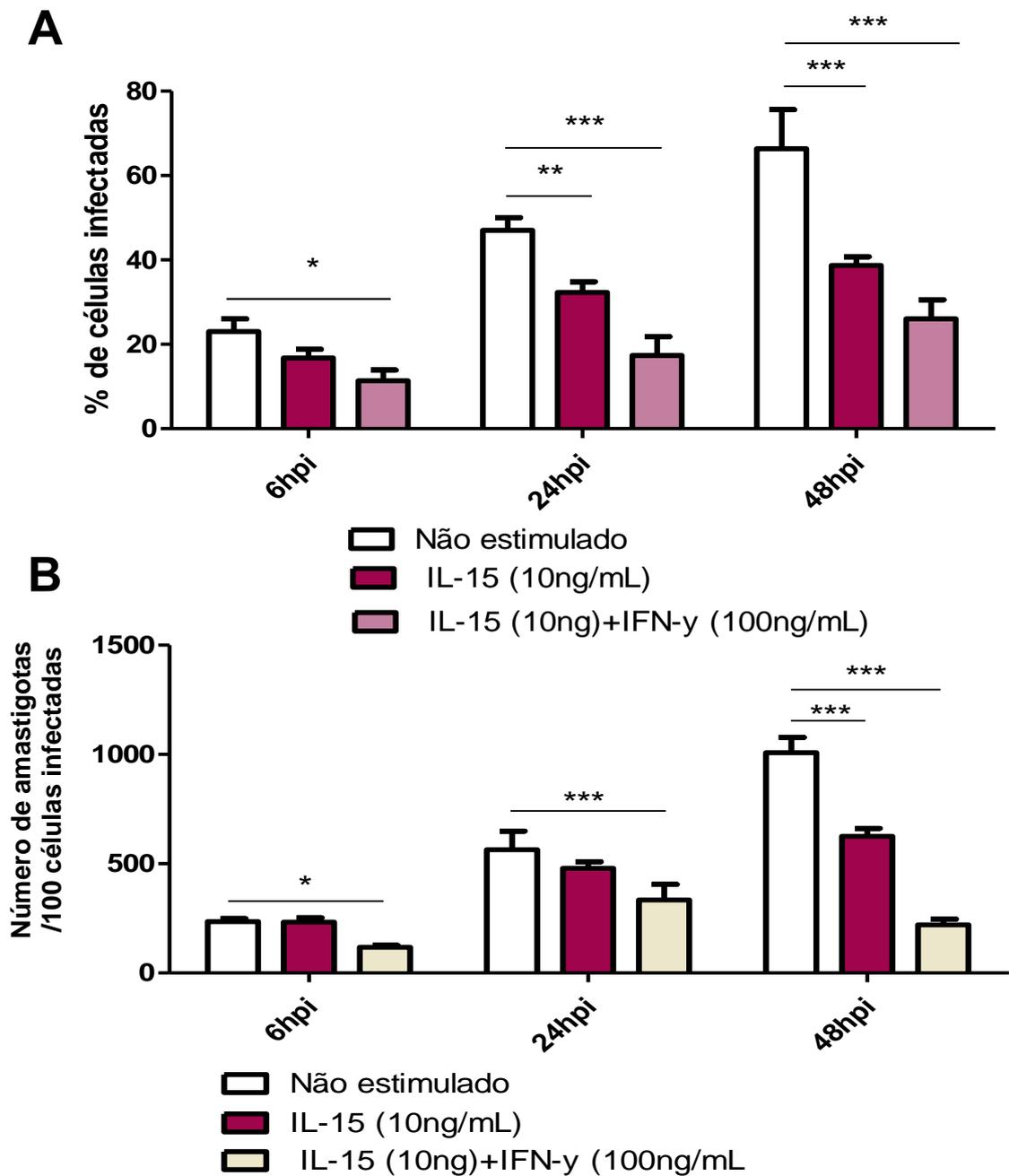


Figura 29: **Porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por 100 células infectadas em macrófagos murinos previamente estimulados com IL-15 infectados com *T. cruzi*.** Macrófagos murinos previamente estimulados com IL-15 (10ng/ml) e/ou IFN- $\gamma$ (100ng/ml) foram infectados na proporção de 5:1 parasitos por célula. **(A)** Porcentagens de células infectadas em diferentes tempos de infecção. **(B)** Número de amastigotas por 100 células infectadas. No eixo x do gráfico estão indicados os tempos de infecção. O asterisco acima de cada barra contida no gráfico representa uma diferença estatisticamente significativa comparada com as células infectadas, mas não estimuladas ( $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$  e  $p < 0,001 = ***$ ).

A fim de obter mais informações acerca do mecanismo desencadeado por IL-15 trans-apresentada (Sandau *et al.*, 2004) em relação ao aumento da ação tripanocida em macrófagos previamente estimulados observados na figura anterior, decidimos quantificar indiretamente a produção de óxido nítrico por parte destas células, nas condições observadas, pelo método de Griess. Como é possível observar nos dados da figura 30, há um aumento da produção de óxido nítrico por parte das células que foram estimuladas com IL-15 recombinante a partir de 24 horas do início da infecção, e este aumento parece ser potencializado pelo co-estímulo com interferon-gama.

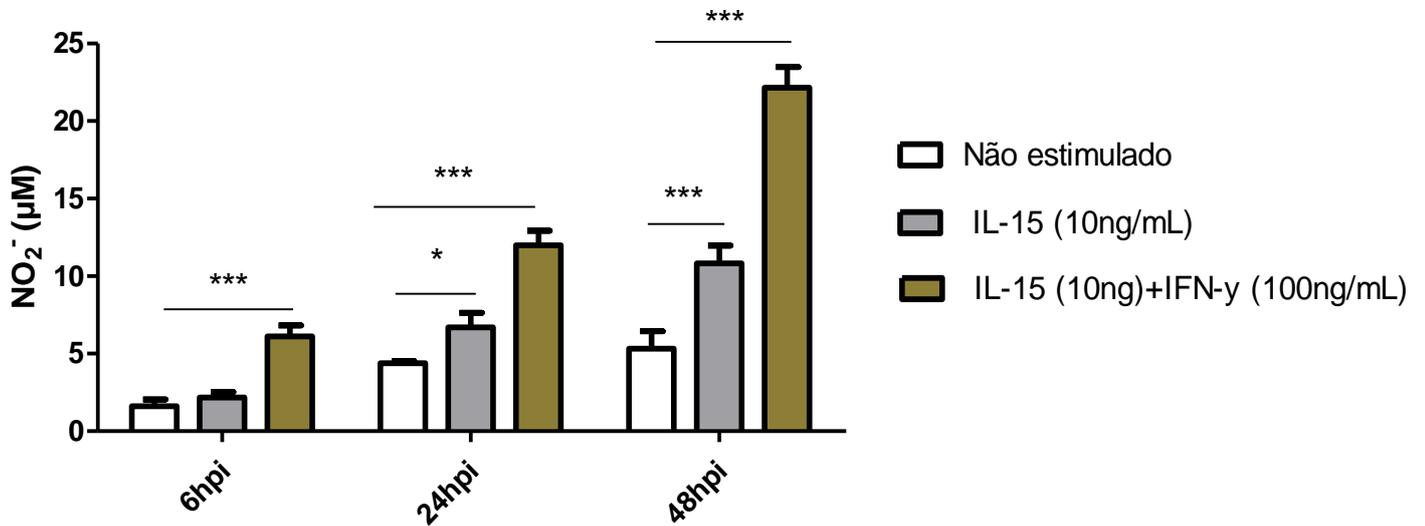


Figura 30: **Produção de óxido nítrico por macrófagos murinos previamente estimulados com IL-15 infectados com *T. cruzi*.** Macrófagos murinos previamente estimulados com IL-15 (10ng/mL) foram infectados na proporção de 5:1 parasitos por célula. A produção de óxido nítrico foi quantificada indiretamente pelo método de Griess. O asterisco acima de cada barra contida no gráfico representa uma diferença estatisticamente significativa comparado com as células infectadas, mas não estimuladas ( $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,001 = ***$ ).

#### **4.8 Infecção de macrófagos peritoneais murinos nocautes para IL-15 com tripomastigotas de *T. cruzi***

Com o objetivo de observar os efeitos biológicos de IL-15 intracelular durante a infecção por *T. cruzi*, macrófagos peritoneais murinos foram infectados com a forma tripomastigota numa proporção de 5:1 parasitos por célula. Foram comparadas as infecções de macrófagos de camundongos selvagens com camundongos nocaute para IL-15, gentilmente cedidos pelo Dr. Herbert Tanowitz do “Institute for Animal Studies do Albert Einstein College of Medicine”, nos EUA. Neste ensaio foram observadas as porcentagens de células infectadas, para macrófagos selvagens, com média de 25,41% e 52,55% nos tempos de 3 e 48 horas, respectivamente. Para macrófagos de camundongos nocautes para IL-15 foram observadas porcentagens de células infectadas com média de 16,38% e 18,33% nos tempos de 3 e 48 horas, respectivamente. Não foi observada uma diferença estatisticamente significativa no período de 3 horas pós infecção. Contudo, foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa no período de 48 horas pós infecção, o que correspondeu a uma redução em torno de 60,5% nas porcentagens dos macrófagos infectados nocaute comparados aos macrófagos selvagens infectados (figura 31A). Do mesmo modo, o número de amastigotas por células infectadas apresentou diferença estatisticamente significativa, também, no período de 48 horas pós infecção. Para os macrófagos de camundongos selvagens para IL-15, a média de amastigotas a cada 100 células infectadas foi de 195 e 791 nos tempos de 3 e 48 horas respectivamente. Por outro lado, nos camundongos nocautes para IL-15 a média foi de 156 e 389 nos tempos de 3 e 48 horas, respectivamente (figura 31B).

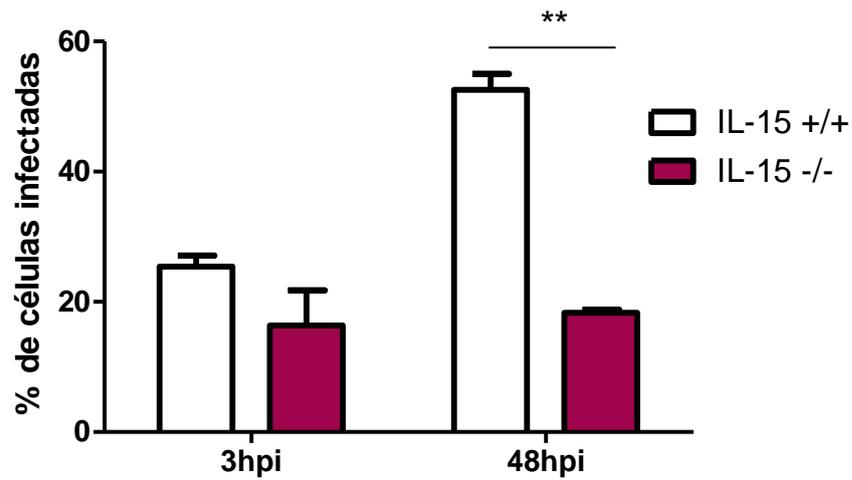
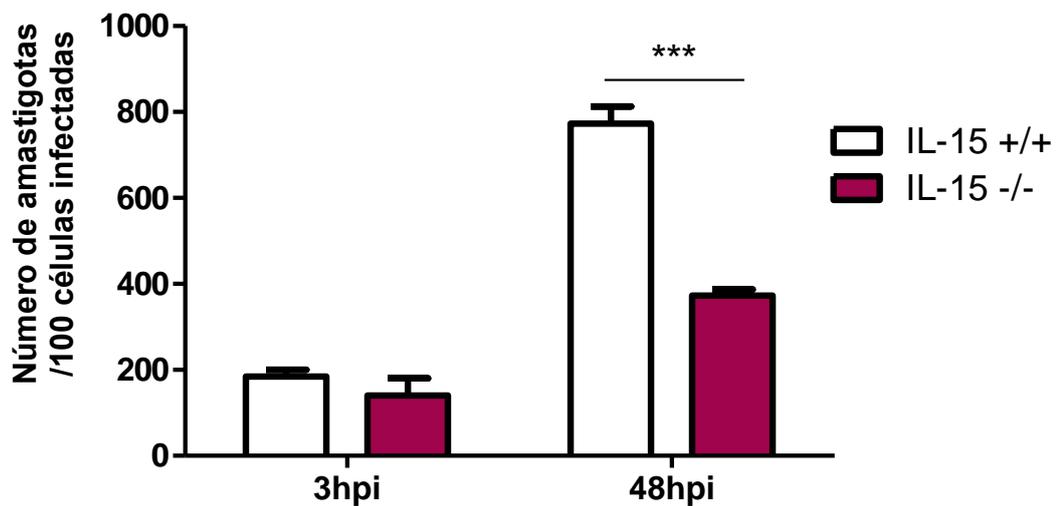
**A****B**

Figura 31: **Porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por 100 células infectadas em macrófagos murinos nocautes para IL-15 infectados com *T. cruzi*.** Macrófagos murinos nocautes para IL-15 foram infectados na proporção de 5:1 parasitos por célula. **(A)** Porcentagens de células infectadas em diferentes tempos de infecção. **(B)** Número de amastigotas por 100 células infectadas. No eixo x do gráfico estão indicados os tempos de infecção. O asterisco acima de cada barra contida no gráfico representa uma diferença estatisticamente significativa entre as condições observadas ( $p < 0,01 = **$  e  $p < 0,001 = ***$ ).

## 5. Discussão

---

*Trypanosoma cruzi* apresenta um complexo ciclo de vida em ambos hospedeiros vertebrados e invertebrados, envolvendo alterações em sua forma celular, passando por vários estágios de desenvolvimento que são conhecidos como amastigota, epimastigota e tripomastigota, sendo que o estágio amastigota é aquele capaz de se dividir dentro e fora das células hospedeiras (Rodrigues *et al.*, 2014).

Um dos mais importantes desafios para se compreender os mecanismos pelos quais se estabelece a doença de Chagas seria, justamente, o estudo dos fatores envolvidos na interação parasito-hospedeiro. Ao se estudar a interação parasito-hospedeiro durante a infecção por *T. cruzi*, deve-se levar em consideração que sua população diverge muito nos aspectos bioquímicos, de virulência e de patogênese (Yoshida, 2006; Espinoza *et al.*, 2010; Revollo *et al.*, 1998; Pena *et al.*, 2015), e que são gerados diferentes tipos de respostas durante as fases da doença, dadas as diferentes composições genéticas dos hospedeiros que são estudados tanto na infecção experimental, quanto na infecção humana (Miles *et al.*, 1981; Higuchi *et al.*, 2003). Estudar a interação do parasito com a célula hospedeira pode ajudar a elucidar questões acerca de reconhecimento, invasão, estabelecimento do ciclo intracelular no hospedeiro, e principalmente, saber sobre fatores que viabilizam a replicação dos amastigotas e das mudanças que ocorrem na célula hospedeira durante este estágio da infecção.

Atualmente, existem vários métodos pelos quais se pode estudar a interação entre proteínas e, conseqüentemente, elucidar o seu papel, que no caso das amastinas, possivelmente seria no estabelecimento da infecção por *T. cruzi*. Esses métodos podem ser classificados em três grupos: *in vitro*, como por exemplo: purificação por cromatografia de afinidade seguida de espectrometria de massa, que envolve a marcação da proteína de interesse, com etapas de purificação e análise espectroscópicas; co-immunoprecipitação, que testa interações entre complexos de proteínas, baseando em suas formas nativas, utilizando extrato celular total; cristalografia de raios-X, que permite visualização das estruturas das proteínas em nível atômico, aumentando a compreensão da interação entre proteínas e sua função; e espectroscopia de ressonância magnética, que também permite detectar interações

entre proteínas, mesmo que essas sejam muito fracas. Em relação aos métodos *in vivo*, podemos citar a técnica do duplo-híbrido de leveduras, que normalmente utiliza dois híbridos de levedura, para detecção de possíveis interações entre proteínas em meio biológico (Young *et al.*, 1998; Joung *et al.*, 2000; Hurt *et al.*, 2003; Fields & Song, 1989; Keegan *et al.*, 1986; Ma J. & Ptashne, 1987; Ito T. *et al.*, 2001). Para as metodologias *in silico*, como exemplo, temos: a abordagem de sequência baseada em ortólogo, que se baseia na natureza homóloga de proteínas anotadas usando um algoritmo de pareamento local das sequências; a abordagem de sequência baseada em pareamento e domínios, que prevê interações de proteínas domínio-domínio; a abordagem baseada na estrutura, que prevê interações proteína-proteína, levando em consideração suas estruturas primárias, secundárias e terciárias; a abordagem do *gene neighborhood*, que observa se o gene analisado é conservado em vários genomas, tendo, assim, uma potencial possibilidade de ligação funcional entre as proteínas codificadas por esses genes relacionados; a fusão gênica, que às vezes é chamada como método Rosetta, que se baseia no conceito de que algumas proteínas de apenas um único domínio possam ser fusionadas com proteínas de outros organismos, formando um multi domínio e a árvore filogenética, que prevê a interação proteína-proteína com base na história evolutiva da proteína (para uma revisão, veja, Rao *et al.*, 2014).

Buscando elucidar o papel das amastinas e sobre a proteínas que poderiam interagir com elas durante a permanência do parasito no interior das células, o nosso grupo de pesquisa desenvolveu ensaios de duplo híbrido. Essa metodologia foi escolhida, pelo fato de não se saber quais proteínas poderiam interagir com as amastinas, e por essa técnica ser mais adequada para estudos voltados para a identificação, em uma biblioteca aleatória de proteínas, das potenciais proteínas que possam interagir com uma proteína de interesse. Esta técnica já foi utilizada em vários trabalhos que estudaram diversos organismos patogênicos, como por exemplo: *C. albicans* (Stynen *et al.*, 2010), *E. coli* (Wang *et al.*, 2011), *M. tuberculosis* (Lin *et al.*, 2012), *P. falciparum* (Brown *et al.*, 2011), Influenza vírus (Huang *et al.*, 2013), *Leishmania* (Meleppattu *et al.*, 2015). Em relação ao *T. cruzi*, a maioria dos trabalhos envolvem a detecção da interação de proteínas regulatórias envolvidas na transcrição e processamento de RNA (Cribb & Serra, 2009; Singh *et al.*, 2014). Porém ainda não

se havia utilizado essa técnica durante a infecção por *T. cruzi* como foco na interação com as proteínas do hospedeiro.

Nos ensaios de duplo híbrido, a primeira alça hidrofílica da amastina foi usada como isca contra uma biblioteca de cDNAs humanos composta por aproximadamente 20 mil genes, sendo possível detectar 10 clones positivos. Dois desses clones continham a sequência que codificava IL-15 humana. Porém, esses ensaios necessitam de validação, pois há chances de ocorrer um grande número de interações falso-positivas, ou interação que não se pode detectar, levando a resultados falso-negativos. Para se estabelecer um ensaio de duplo híbrido, deve-se levar em consideração que as proteínas que se quer testar devam se localizar no interior das células e, também, que as proteínas não vão estar em seu ambiente fisiológico natural, podendo fazer com que elas não se dobrem corretamente, interferindo na sua capacidade de interação (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001; Semple *et al.*, 2002; James *et al.*, 1996).

Na tentativa de validar os resultados obtidos nos ensaios de duplo híbrido, o nosso grupo de pesquisa desenvolveu ensaios de “pull down” utilizando IL-15 recombinante fusionada com uma cauda de histidina e a alça extracelular de amastina fusionada com a proteína GST. Porém, nossos resultados foram inconclusivos, possivelmente devido ao fato de as proteínas produzidas terem sido encontradas insolúveis, sendo necessário tratá-las com agentes solubilizantes, não se sabendo, dessa forma, se a estrutura das proteínas recombinantes seria a mesma das proteínas nativas, ou se as condições usadas durante o experimento são as ideais para que a interação ocorra. Pensando em otimizar esse ensaio e diminuir todo esse viés, pretendemos realizar o ensaio de “pull down” utilizando extratos celulares de parasitos super expressando amastina::GFP, por exemplo. Ainda podemos realizar o ensaio de co-immunoprecipitação de amastina e IL-15 a partir de lisados totais de células produtoras de IL-15 infectadas com *T. cruzi* expressando amastina::GFP e identificar por meio de espectrometria de massas, por exemplo, todas as proteínas que estariam interagindo com a alça hidrofílica das amastinas. Uma das vantagens da técnica de co-immunoprecipitação é a possibilidade do uso de células eucarióticas que permite que haja modificações pós-traducionais, que podem ser essenciais para que ocorra interação entre proteínas, o que não seria possível em sistemas de expressão procarióticos (Moresco *et al.*, 2010).

A interleucina 15 possui várias características que a difere das outras citocinas, e apesar de compartilhar alguma semelhança estrutural com IL-2, como, por exemplo, o fato de possuir 4- $\alpha$ -hélices, IL-15 não tem sua expressão restrita a apenas células do sistema imune, mas também pode ser encontrada em vários tipos celulares, onde exerce o principal papel de indução da proliferação e inibição de apoptose. A expressão de IL-15 foi relacionada à infecção por diferentes patógenos, como por exemplo: por *Mycobacterium leprae* (Maeurer *et al.*, 1999), *Cryptococcus neoformans* (Mody *et al.*, 1998), *Leishmania infantum* (Milano *et al.*, 2002), *C. parapsilosis* (Németh *et al.*, 2014), vírus HHV-6, HSV, EBV, vírus sincicial respiratório, vírus da estomatite vesiculosa, vírus da gripe, reovírus e vírus Sendai (Fawaz *et al.*, 1999; Flamand *et al.*, 1996) *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Tran *et al.*, 2003).

Em relação à infecção por *T. cruzi*, foi documentada a elevação dos níveis de IL-15 em lesões de tecido cardíaco de pacientes portadores da doença de Chagas cardiomiopática crônica, havendo co-localização, neste local, desta citocina com células CD68 positivas, que é um marcador específico de macrófagos (Fonseca *et al.*, 2007). Apesar de IL-15 possuir duas isoformas, que diferem apenas no tamanho da sequência codificadora do seu peptídeo sinal (Nishimura *et al.*, 2000), a maioria dos trabalhos publicados estuda apenas a sua forma secretada.

Neste trabalho, utilizando a técnica de ELISA de captura, realizamos a quantificação de IL-15, tanto secretada, quanto a sua forma citoplasmática. A dosagem da proteína na sua isoforma citoplasmática foi quantificável em todos os ensaios. Por outro lado, os níveis da forma secretada foram indetectáveis em todos os ensaios de infecção, com exceção da infecção das células H9C2. Acreditamos que a dificuldade de se dosar os níveis de IL-15 secretada esteja no fato de, além de sua produção ser regulada devido ao fino controle que ocorre em todas as etapas de sua expressão, como por exemplo, a presença de vários sítios e iniciação (AUG) localizados na região 5' UTR, ainda haja o controle da sua secreção pelo peptídeo sinal que varia de tamanho nas diferentes isoformas, pois existe uma associação de uma secreção ineficiente à presença do curto peptídeo sinal (Bamford *et al.*, 1996; Tagaya *et al.*, 1997). Outra hipótese para explicar a difícil detecção de IL-15 secretada no sobrenadante de cultura de células, seria o fato de que IL-15R $\alpha$ , componente de alta afinidade, normalmente presente em seu receptor e, que é produzido em maior quantidade comparado a IL-15, possa também existir tanto na forma ligada à

membrana quanto na forma solúvel, que é liberada da membrana por clivagem proteolítica. A secreção da forma solúvel de IL-15R $\alpha$  (sIL-15R $\alpha$ ) no sobrenadante é muito semelhante ao que ocorre com o receptor da IL-6, por exemplo, onde a sua disponibilidade difere muito entre situações fisiológicas e patológicas, afetando as propriedades de sinalização de seu ligante em diversos aspectos (Nowell *et al.*, 2003; Budagian *et al.*, 2004). Foi demonstrado que em camundongos, a geração da forma de solúvel de IL-15R $\alpha$  é mediada pela enzima conversora do TNF, e que na presença de sIL-15R $\alpha$  em fluidos biológicos pode afetar negativamente a disponibilidade de IL-15 livre por competição pela preferência de IL-15 junto ao seu receptor cognato que permanece ligado à membrana. Outro ponto importante é que a habilidade de sIL-15R $\alpha$  em formar complexos com IL-15 pode causar dificuldade de detecção de IL-15 livre em soro ou sobrenadante de cultura celular, uma vez que IL-15 possui dois sítios de ligação para IL-15R $\alpha$  em regiões denominados domínios Sushi (Bulfone-Paus *et al.*, 2006; Budagian *et al.*, 2006; Mortier *et al.*, 2004; Rose-John *et al.*, 2003). Além do mais, trabalhos realizados *in vivo* mostraram que a administração de sIL-15R $\alpha$  em cultura de células NK induziu a inibição da proliferação das células e das respostas de células T antígeno-específicas, mostrando que esta forma solúvel de IL-15R $\alpha$  age de forma a dificultar a interação de IL-15 secretada com seu receptor (Nguyen *et al.*, 2002; Rucker *et al.*, 2005).

Para investigar se *T. cruzi* seria capaz de induzir a expressão de IL-15, macrófagos murinos e diversas linhagens celulares foram infectadas com *T. cruzi* na proporção de 5:1 tripomastigotas por célula. Neste trabalho foi utilizada a cepa Y (TcII), que é uma cepa descrita como reticulotrópica pois, além de infectar músculos, também possui uma maior capacidade de parasitar os fagócitos residenciais e mononucleares inflamatórios em comparação com outras cepas, pelo menos em camundongos na fase aguda da infecção. Sua preferência pela infecção destes tipos de células permite que essas cepas infectem uma variedade maior de tecidos e isso pode estar relacionado ao aumento da virulência (Postan *et al.*, 1983; Andrade *et al.*, 1997; Taliaferro *et al.*, 1955). *T. cruzi* foi capaz de induzir a produção de IL-15 citoplasmática em macrófagos murinos, células L6 e células LLCMK2 a partir de 24 horas após do início da infecção, porém esse efeito estimulatório foi mais persistente nas células LLCMK2, que apresentaram aumentos da expressão de IL-15 citoplasmática em até 96 horas pós infecção, que foi o último tempo analisado para

as linhagens celulares. Esse aumento com maior duração pode ser devido à ausência de *feedback* negativo durante esses tempos, e uma forte responsividade destas células à infecção por *T. cruzi* no que diz respeito a produção de IL-15. Já em macrófagos murinos, o aumento da expressão de IL-15 citoplasmática pode ser observado em até 48 horas após o início da infecção. De modo semelhante às células LLCMK2, as células H9C2, mostraram um aumento da produção de IL-15 citoplasmática a partir de 48 horas pós-infecção, que durou até o último período de tempo observado. Esta linhagem celular foi utilizada em estudos *in vitro* devido a sua morfologia se assemelhar a cardiomiócitos embrionários imaturos e pela vantagem de esse modelo celular ser de fácil manipulação e pela capacidade que as células têm de se proliferar ilimitadamente (Peter *et al.*, 2016). Outra vantagem destas células, é que elas possuem alguns componentes da via de sinalização essencial para sua diferenciação em células musculares cardíacas maduras. Além disso, esses cardiomiócitos embrionários proliferam bem em condições *in vitro*, permitindo uma cultura relativamente fácil (Tan X.A *et al.*, 2010; Louch *et al.*, 2001; Watkins *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2005). Outro fato importante é que apesar de poder infectar uma grande variedade de tecidos e células nucleadas, um restrito grupo de tecidos, como por exemplo músculo esquelético, nervos entéricos e adipócitos estão diretamente envolvidos na patogênese da doença de Chagas. Assim, se observa uma exacerbada infecção e inflamação em células do miocárdio, por exemplo (para uma revisão veja Dias, J.C.P. & Coura, J.R, 1997). Como já documentado, IL-15 foi detectada em nível de mRNA em células cardíacas (Grabstein *et al.*, 1994; Quinn *et al.*, 1995), nas quais IL-15 atuou como um estimulador de tipos específicos de miosina, promovendo a diferenciação de miócitos em fibras musculares. Ainda já foi observado que *T. cruzi* possui grande tropismo por estes tipos celulares (Von *et al.*, 1989; para uma revisão leia Fernandes M.C. & Andrews N.W., 2012).

Em macrófagos murinos, que são células especializadas, foi observado que os níveis de IL-15 citoplasmática tendem diminuir no decorrer da infecção. Isso pode ser devido ao próprio mecanismo de *feedback* que esse tipo de célula exerce por meio da secreção de citocinas antagonistas a IL-15 (Rückert *et al.*, 1998), que são de caráter anti-inflamatório, como é caso de IL-10, por exemplo (Iyer & Cheng, 2012). Uma explicação para o aumento da produção de IL-15 citoplasmática durante o estágio de replicação de *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado, seria o fato de esta citocina ter efeitos

anti-apoptóticos que já foram documentados por diversos trabalhos que envolveram vários tipos celulares expostos a diversas situações. A exemplo disso podem-se citar os efeitos anti-apoptóticos de IL-15 sobre queratinócitos, nos quais inibiu a apoptose induzida por UVB e anti-Fas, além de induzir a proliferação por meio da ativação das vias ERK1/2, PI3K e Akt (Rückert *et al.*, 2000); e em fibroblastos murinos, nos quais a formação do complexo IL-15/IL-15R $\alpha$  foi capaz de reverter os efeitos apoptóticos de TNF-alfa, por meio da ativação das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-XI (Bulfone-Paus *et al.*, 1997; Oh S. *et al.*, 2008). Assim, inibindo a apoptose destas células inevitavelmente sentenciadas à morte devido à infecção, o parasito teria por mais tempo a célula hospedeira e as condições necessárias para sua multiplicação.

Além disso, na análise do sobrenadante de células H9C2 infectadas com *T. cruzi* foi possível detectar a presença de IL-15 secretada desde as primeiras horas após o início da infecção. Mesmo sendo em valores bem reduzidos em relação àqueles encontrados para análise dos extratos celulares, foi possível observar um aumento significativo na maioria dos tempos analisados. Trabalhos anteriores já documentaram a detecção de IL-15 secretada em diferentes situações, nas quais obtiveram valores semelhantes aos que foram encontrados para células H9C2 neste trabalho, como por exemplo: em soro de pacientes portadores de leishmaniose visceral (Milano *et al.*, 2001), no sobrenadante de células HeLa estimuladas com TNF-alfa (Ouyang *et al.*, 2013), no sobrenadante de macrófagos infectados por *L. Infantum* (DeOliveira F.A. *et al.*, 2015), no sobrenadante de células B16 e Hepa infectadas por um vírus recombinante LX/(IL-15), que expressava IL-15 (Xu *et al.*, 2017). Por outro lado, Bamford e colaboradores (1996) relataram a dificuldade de se detectar IL-15 em sobrenadante após a análise de diferentes tipos de células, mostrando que a liberação de IL-15 secretada no sobrenadante de células se relaciona com o tipo celular, o tipo de estímulo ou patógeno e as condições as quais foram obtidas e analisadas as amostras. Devido a esta dificuldade de se detectar IL-15 secretada no sobrenadante de cultura celular é que alguns autores sugerem, neste caso, realizar a concentração de, pelo menos 5 vezes, do conteúdo do sobrenadante coletado para análise (Saeed *et al.*, 2001).

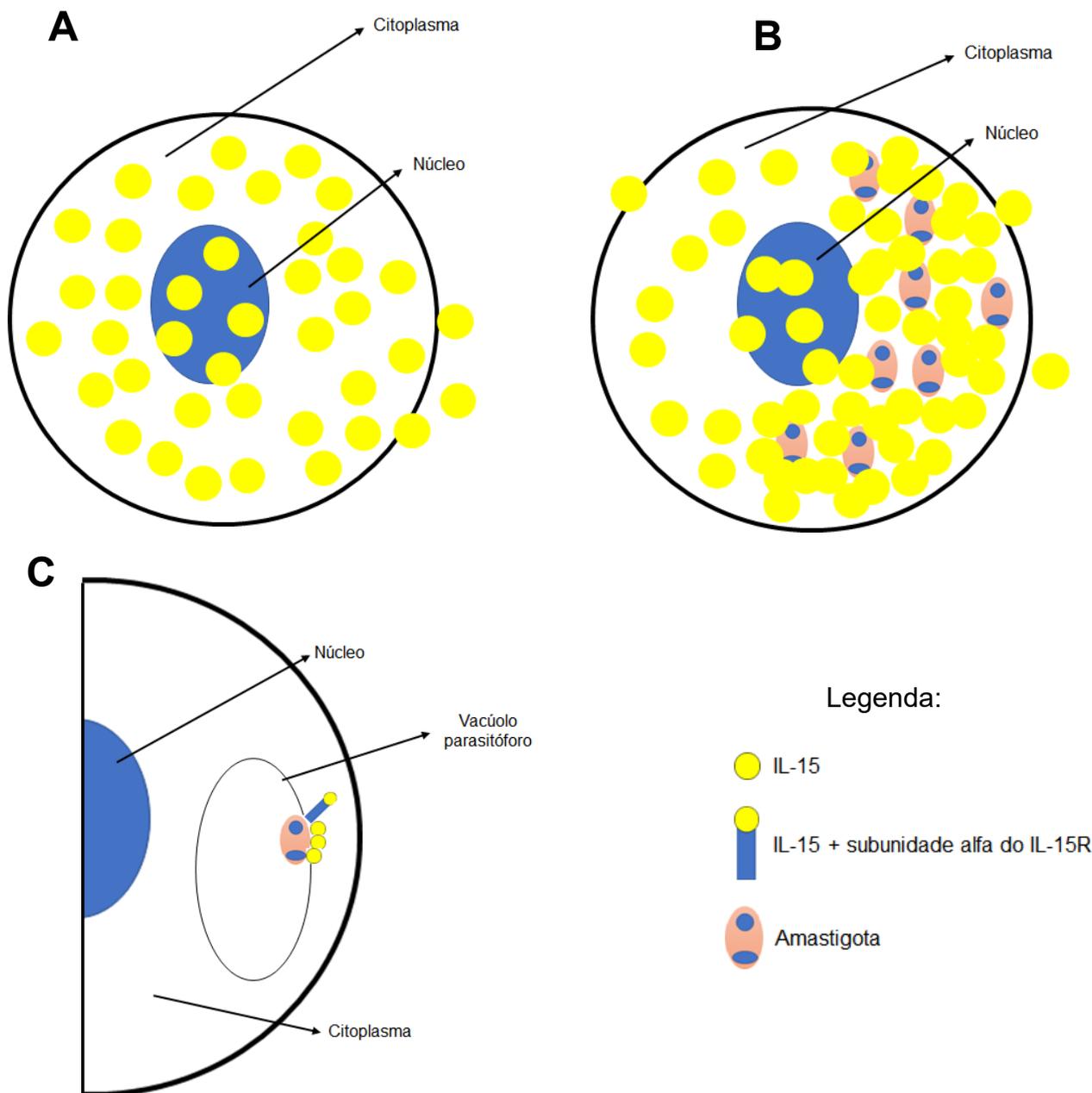
Neste trabalho, utilizamos, paralelamente à infecção por *T. cruzi*, o modelo de infecção por *L. amazonensis*, parasito o qual é reponsável por cerca de 8% dos casos de leishmaniose cutânea no Brasil (Camara *et al.*, 2011). Além do mais, ao contrário

de outras espécies de *Leishmania*, durante a infecção por *L. amazonensis* há a formação de um largo e espaçoso vacúolo parasitóforo, com elevado número de amastigotas por vacúolo (Real *et al.*, 2008), que pode estar relacionado, por exemplo, com a evasão do parasito em relação à resposta imune do hospedeiro, por promover um ambiente onde as enzimas envolvidas na lise dos parasitos, estejam relativamente diluídas (Alpuche-Aranda *et al.*, 1994; Real *et al.*, 2010). Assim, após o sequenciamento do genoma de *L. amazonensis*, em 2013, foi possível obter informações acerca do estabelecimento da interação parasito-hospedeiro, mostrando que assim como *L. mexicana* há a presença de representantes da família das amastinas que são únicas para o gênero, e que poderiam estar relacionadas com a difusão da forma cutânea da doença. Por meio de análises de bioinformática, foi possível, também, estabelecer padrões de interação de proteínas do parasito com proteínas do hospedeiro, como é o caso de protaínas do choque térmico do parasito que interagem com receptores do tipo Toll 9 (TLR9) do hospedeiro, inibindo a expressão de expressão de óxido nítrico, beneficiando, desta forma, a proliferação do parasito (Real *et al.*, 2013).

A infecção de macrófagos murinos por *L. amazonensis* induziu a uma redução nos níveis de IL-15 intracelular nas horas iniciais da infecção. Esse achado corrobora um estudo que envolveu a análise do perfil transcriptômico de macrófagos murinos infectado por *L. major*, que apesar de apresentar perfil de infecção e características diferentes de *L. amazonensis*, mostrou uma regulação negativa de mRNA de IL-15 em 4 horas após a infecção (Real *et al.*, 2008, Real *et al.*, 2013, Dillon L.A *et al.*, 2015). Outros experimentos envolvendo a infecção por *Leishmania* mostraram um perfil de regulação negativa semelhante ao que foi observado neste trabalho. Uma possível explicação para essa redução nos níveis de IL-15 intracelular é que durante a infecção por *Leishmania* haja forte produção de IL-10, que se envolve diretamente no mecanismo de *feedback* negativo da produção de IL-15. Estudos já demonstraram que a infecção por *L. donovani* causou a supressão da IL-12, com significativo aumento de IL-10 (Chandra D. & Naik S, 2008), corroborando os nossos resultados, uma vez que já foi demonstrado que IL-15 é um importante estimulador para IL-12 (Avicé *et al.*, 1998). Assim inibindo a síntese de IL-15, haveria, conseqüentemente, a redução nos níveis de IL-12. Deste mesmo modo, a infecção por *Leishmania*, também, induz uma forte expressão de IL-4, polarizando a resposta

inflamatória para o tipo Th1, com conseqüente redução nos níveis de IL-12, IFN- $\gamma$  e produção de NO por macrófagos (Alexander J. *et al.*, 1999).

Nos casos de infecção por *T. cruzi* e *Leishmania*, por meio de ensaios de imunofluorescência, foi possível observar uma reorganização na distribuição da IL-15 citoplasmática, levando uma aglomeração da proteína em regiões em volta dos parasitos ao contrário da célula não infectada, onde IL-15 assume uma distribuição difusa. A proteína que foi produzida em excesso, devido a infecção, mostrou tendência a se concentrar no citoplasma da célula, local onde ocorre a replicação do parasito. Esse aumento da concentração de IL-15 em locais próximos dos parasitos pode se relacionar com o fato que no meio intracelular, IL-15R $\alpha$  se encontra ligada com IL-15 via seu domínio Sushi, atuando como uma chaperona. Essa interação com IL-15, além de garantir o aumento da meia-vida da IL-15, induz formação de agregados, mediando sua ligação à membrana (Bergamaschi C. *et al.*, 2009; Giri *et al.*, 1995; Mortier *et al.*, 2004; Lorenzen *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005). Pois assim como ocorre na membrana nuclear, a ligação de IL-15 com a membrana do parasito poderia ser ancorada por esse receptor (Barzegar *et al.*, 1998; Pereno *et al.*, 2000). Um outro fato importante é que a formação desse complexo ligado à membrana celular induz a uma reciclagem trans-endossomal das duas moléculas e isso promove uma maior duração de IL-15 ligada à membrana (Dubois *et al.*, 1999; Dubois *et al.*, 2002; Barzegar *et al.*, 1998; Pereno *et al.*, 2000). O fato de IL-15 possuir 4 hélices alfa nos dá indícios de que a proteína por si só possa existir de forma ligada à membrana através das chamadas balsas lipídicas (Goebel *et al.*, 2002; Vámosi *et al.*, 2004). Isso, também, poderia explicar o fato de IL-15 se co-localizar com a forma amastigota de *L. amazonensis*, mesmo este parasito estando separado do citoplasma da célula pela membrana do vacúolo parasitóforo. Uma observação importante na infecção de células L6 por *T. cruzi*, foi a presença de um aglomerado proteico de IL-15 claramente co-localizando em volta das formas amastigotas de *T. cruzi*. Neste tipo celular houve uma maior e mais nítida co-localização de IL-15 com o parasito. Isso é muito importante dado que durante a infecção por *T. cruzi*, o parasito tende a se estabelecer em células e tecidos musculares (Araujo-Jorge *et al.*, 1992). Pela representação gráfica da figura 32, é possível observar como se dá o perfil de interação e distribuição de IL-15 citoplasmática durante a infecção por *T. cruzi* e *L. amazonensis*.



**Figura 32: Interação de IL-15 citoplasmática com os amastigotas de *T. cruzi* e *L. amazonensis*.** Por meio da observação das imagens de imunofluorescência podemos especular sobre como se dá a distribuição de IL-15 citoplasmática durante a infecção por *T. cruzi* e *L. amazonensis*. Em células não infectadas, cuja produção de IL-15, tanto citoplasmática, quanto secretada se encontra em níveis basais devido a sua expressão constitutiva. Assim, é possível observar uma distribuição difusa da citocina intracelular nos compartimentos citoplasmático e nuclear (A). Quando a célula é infectada, além de haver uma alteração na produção da citocina, há, também, uma reorganização da distribuição da citocina, que começa a se concentrar em regiões próximas ao parasito (B). No caso da infecção por Leishmania, essa polarização e interação pode ser possível devido às características de IL-15, sua estrutura ser de 4 hélices alfa e de estar ligada à cadeia alfa de seu receptor, o que a possibilita estar ancorada tanto na membrana celular, quanto em compartimentos intracelulares, como o vacúolo parasitóforo, por exemplo (C).

Os nossos dados de ELISA estão de acordo com dados da literatura que mostram, por meio de análises de transcriptoma em diferentes tipos celulares e de amostras de tecidos, a elevação do mRNA de IL-15 nas horas iniciais da infecção por *T. cruzi* quando comparadas com os controles não infectados (Li Y. *et al.*, 2016; Houston *et al.*, 2016; Fernandes *et al.*, 2016; Christensen *et al.*, 2016; Dillon *et al.*, 2015).

Quando macrófagos peritoneais murinos foram tratados com IL-15 (10ng/mL) por 24 horas e em seguida infectados com *T. cruzi*, houve significativa redução do número de amastigotas em 24 e 48 horas após o início da infecção. Além desse estímulo, foi utilizado um co-estímulo com interferon gama (100ng/mL), que além de induzir uma ação tripanocida em macrófagos murinos mais precocemente, ainda potencializou os efeitos de IL-15 em 24 e 48 horas após o início da infecção. Esses dados remetem a um duplo papel de IL-15, que tem sua disponibilidade no meio extracelular controlada basicamente pela sua taxa de secreção, uma vez que as duas isoformas são estruturalmente idênticas, diferindo apenas no tamanho do seu peptídeo sinal (Grabstein *et al.*, 1994) De igual maneira, existem alguns trabalhos que associam a morte de patógenos com a elevação dos níveis de IL-15 em soro de pacientes ou sobrenadante de cultura de células, como é o caso do trabalho que avaliou a taxa de multiplicação de *L. infantum* em macrófagos previamente estimulados com IL-15 em diferentes concentrações, mostrando que a partir do estímulo com 10ng/mL da citocina recombinante, já se poderia observar uma redução significativa do crescimento parasitário (D'Agostinho *et al.*, 2004).

Sabendo da importância da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos no combate à infecção por diferentes patógenos e que estas células imunes são as principais produtoras de óxido nítrico (Koo J. *et al.*, 2016), nos perguntamos se o efeito tripanocida observado pelo estímulo com IL-15 recombinante era devido à indução do aumento da produção de óxido nítrico. Um aumento considerável de óxido nítrico nas células que haviam sido estimuladas por IL-15 foi observado e mais uma vez a co-estimulação com interferon gama potencializou o aumento da produção de óxido nítrico. Vários autores já demonstraram que a enzima óxido nítrico sintase, responsável pela produção de NO, tem um papel decisivo na atividade tripanocida, e que o bloqueio desta enzima abole completamente a atividade tripanocida por parte de macrófagos ativados. Foi demonstrado que o tratamento de

camundongos C57BL/6 infectados com inibidores de NO sintase aumentou a parasitemia e mortalidade (Nogueira & Cohn, 1978; Reed *et al.*,1987; Vespa *et al.*,1994).

Atualmente há disponíveis uma série de estratégias para se estudar a função de um gene, dentre estas, o nocaute por recombinação homóloga se apresenta muito eficiente. Realizar metodologias como esta para elucidar a função das amastinas em *T. cruzi* não é possível devido a existência de várias cópias de amastinas presentes no genoma do parasito. Na tentativa de testar nossa hipótese da possível interação das amastinas com IL-15, e o possível papel desta citocina em benefício da viabilidade do parasito, camundongos C57BL/6 machos nocautes para IL-15, foram importados dos Estados Unidos, do Institute for Animal Studies do Albert Einstein College of Medicine. Durante todo este trabalho foi tentado o estabelecimento de colônias de camundongos nocautes para IL-15 por meio do cruzamento destes camundongos machos nocautes para IL-15 com fêmeas selvagens obtidas no biotério Central da UFMG. No trabalho que descreve como os camundongos nocautes para IL-15 foram gerados, Kennedy e colaboradores (2000) documentaram que apesar de não ter sido observada nenhuma anormalidade histológica ou infecção generalizada, o nocaute de IL-15 provocou redução no peso absoluto médio dos linfonodos periféricos quando comparados aos camundongos selvagens. Foi observada, também, uma redução no número absoluto de células NK e redução de 2 vezes do número absoluto de linfócitos intraepiteliais CD3 positivos. Foi relatado que camundongos nocautes permaneceram saudáveis quando mantidos sob condições livres de patógenos. Contudo, devido aos defeitos graves na função das células NK e à redução seletiva nas células T CD8+ periféricas, quando infectados pelo vírus Vaccinia, esses camundongos apresentaram severas morbidades como: pele arruinada, aparência curvada, atividade reduzida e sinais de febre e caquexia. Foi observado, também, que células dendríticas e macrófagos derivados de camundongos nocautes para IL-15 apresentavam expressão reduzida de IL-12, interferon gama de óxido nítrico durante diferentes estímulos (Ohteki *et al.*, 2001). O estabelecimento desta colônia de camundongos nocautes para IL-15 seria imprescindível para testar nossa hipótese de que IL-15 contribui, de forma positiva, na viabilidade das formas amastigotas de *T. cruzi*, pois como mostrado em nossos resultados preliminares, a ausência desta citocina induz a uma redução nos índices de infecção após 48 horas do início da infecção. Dessa

forma, após o estabelecimento desta colônia, continuaremos nossos experimentos com as repetições *in vitro* e prosseguiremos para os testes *in vivo*, que além da cepa Y, envolverá outras cepas de *T. cruzi*.

Coletivamente, nossos resultados mostram que a isoforma intracelular de IL-15 poderia exercer um papel muito importante na viabilidade da replicação de *T. cruzi* no interior da célula. Essa citocina estaria intimamente ligada à multiplicação dos parasitos no interior da célula e ainda atuaria na promoção da inibição do apoptose destas células. Acreditamos que os níveis de IL-15 secretada e não secretada durante a infecção seriam regulados no sentido de controlar a infecção, porém existiriam alguns parasitos, como no caso de *T. cruzi*, que induziriam a produção da proteína intracelular, quebrando esse equilíbrio para favorecer a si. Acreditamos que esta interação seja mediada pelas amastinas ou por um complexo proteico associado a elas, pelo fato de que na forma amastigota há elevada produção das amastinas e por sua localização estratégica na membrana do parasito. Porém, para validar nossa hipótese de que a interação da IL-15 intracelular com a forma amastigota de *T. cruzi* seria devido à presença das amastinas, ainda será necessário realizar alguns experimentos que farão parte das perspectivas para concluir este trabalho.

Além do mais, foram feitas tentativas de demonstrar a presença de IL-15 citoplasmática por outras metodologias, como por exemplo western blotting que é uma técnica amplamente utilizada para identificar e quantificar proteínas. A maioria dos trabalhos que envolve a quantificação de IL-15 utiliza técnicas como PCR em tempo real, imunohistoquímica e ELISA, que, no momento, é o padrão ouro para quantificação de citocinas, e muitos deles estão citados neste trabalho. Porém, alguns autores documentaram as mesmas dificuldades que encontramos durante os ensaios de western blotting. Saeed e colaboradores (2001) avaliaram a produção e distribuição de IL-15 em amostras da interface de tecido de articulações que haviam apresentado rejeição a implantes. Além de reconhecer múltiplas bandas, sendo a maioria, com massa molecular entre 63-65 kDa, o anticorpo anti-IL-15 também reconhecia bandas de 13-14kDa, por isso foi sugerido que essas múltiplas bandas poderiam ser correspondentes a IL-15 em diferentes fases de processamento, denominadas pré-pro-IL-15, cujo processamento seria similar ao da insulina (Fu Z. *et al.*, 2013). Após tratamento enzimático, que utilizou N-glicopeptidase F, foi possível observar bandas menores, inclusive de 13-14kDa. Por outro lado, Escudero-Hernández e

colaboradores (2017) analisaram a presença de IL-15 em amostras de tecido de duodeno de pacientes portadores da doença celíaca, utilizando um anticorpo anti-IL-15 monoclonal. Assim, foi possível detectar a presença de múltiplas bandas, inclusive aquela que correspondia ao peso de 15 kDa. Porém, quando utilizado um anticorpo anti-15R $\alpha$ , também era possível detectar essas mesmas múltiplas bandas, cujas massas variavam entre 40-56kDa. Sendo assim, foram indicadas sendo resultado da formação de um complexo composto por IL-15 e a cadeia alfa de alta afinidade que compõe o seu receptor. Em relação a muitas citocinas, inclusive IL-15, já havia sido reportada a sua capacidade de serem N-glicosiladas ou formar oligômeros (Balknill, 1996). Por outro lado, Ouyang e colaboradores (2013) apontam o fato de que, no ambiente citoplasmático, IL-15 interage fortemente com a cadeia  $\alpha$  de alta afinidade de seu receptor, que atua como uma chaperona, lhe conferindo maior estabilidade e meia-vida (Duitman *et al.*, 2008). Dessa forma, ainda há necessidade de padronizar os ensaios de western blotting, para detecção de IL-15, em nossos trabalhos, pois temos interesse em obter informações acerca da integridade da banda referente a citocina nas situações abordadas e possuir, assim, mais uma metodologia com a qual seja possível certificar dos resultados encontrados até o momento. Pelo fato de não ter sido possível, até o momento, detectar a banda, de aproximadamente 15 kDa, referente a massa molecular de IL-15 por meio do western blot, surgiu a necessidade de testar a especificidade do anticorpo anti-IL-15 que utilizamos nos ensaio de imunofluorescência, pois pelo fato de IL-15 ter uma estrutura formada por 4  $\alpha$ -hélices, semelhante às amastinas (Teixeira *et al.*, 1994; Rochette *et al.*, 2005; Grabstein *et al.*, 1994; Pettit *et al.*, 1997; Chirifu *et al.*, 2007), o anticorpo utilizado poderia estar interagindo, também, com estas últimas proteínas, o que poderia, de certo modo, não gerar resultados falso-positivos, mas superestimá-los, uma vez que houve detecção de IL-15, mesmo em células não infectadas como mostrado nos ensaios de ELISA. Desta forma, um dos experimentos que serão realizados, envolverá a incubação de extrato de amastigotas extracelulares com anticorpo anti-IL15, com posterior análise por western blotting. Após essas validações, nosso próximo passo será validar o experimento de duplo híbrido com uma sequencia de experimentos que visam testar a nossa hipótese da interação das amastinas com IL-15. Além de realizar ensaios de *pull-down*, desta vez com células que sabidamente produzem IL-15 infectadas com *T. cruzi*, realizaremos ensaios de co-immunoprecipitação usando anticorpo anti-IL-15 e

extratos proteicos de macrófagos ou linhagens celulares infectadas com cepas de *T. cruzi* expressando  $\delta$ -amastinas em fusão com a proteína GFP ou com Tag de HA.

Utilizaremos a técnica de edição gênica por CRISPR em *T. cruzi*, a fim de estabelecer o nocaute das amastinas. Será que, com o nocaute das amastinas, o *T. cruzi* ainda conseguiria se multiplicar dentro das células? Haveria alguma alteração no perfil de localização de IL-15 citoplasmática observado nos ensaios de imunofluorescência quando as células fossem infectadas por esses parasitos que tiveram as amastinas nocauteadas por CRISPR? Também realizaremos ensaios de infecção *in vitro*, com *T. cruzi*, em fibroblastos super-expressando IL-15 citoplasmática. Será que a super-expressão desta citocina beneficiaria a replicação do parasito no interior da célula? E até que ponto este aumento na produção de IL-15 seria favorável para o parasito e, também, para a célula hospedeira?

Outra hipótese é que, além de interagir com as amastinas ou proteínas associadas a elas, IL-15, também, seria capaz de transduzir sinalização por meio desta interação, pois as amastinas serviriam como uma espécie de receptor (*vide* esquema da figura 33). Para testar esta hipótese, um dos experimentos que serão realizados envolverá a incubação de amastigotas extracelulares geradas *in vitro* com IL-15 recombinante. Haveria alguma alteração nos índices de replicação, ou até mesmo, na morfologia destes parasitos? E que tipo de sinalização esta citocina estaria desencadeando nos amastigotas? Ensaios semelhantes aos que foram realizados por Paiva e colaboradores (2015), utilizando *Leishmania braziliensis* que tiveram as  $\delta$ -amastinas silenciadas por RNAi, serão feitos a fim de esclarecer se esse silenciamento afeta a interação dos amastigotas com IL-15, testando, mais uma vez se a interação dos parasitos, observada pelos ensaios de imunofluorescência, foi de fato, com IL-15. Se a interação for mediada pelas amastinas, o silenciamento destas afetaria a localização de IL-15 junto ao parasito?

Ao estabelecer a colônia dos camundongos nocautes para IL-15, retomaremos os ensaios de infecção *in vitro* dos macrófagos obtidos a partir destes animais, e teremos a oportunidade de realizar os primeiros ensaios de infecção *in vivo*, de animais nocautes para IL-15, com *T. cruzi*. Certamente, esses ensaios poderão ajudar a elucidar um pouco mais acerca da patogênese da doença de Chagas e esclarecer até que ponto a IL-15 contribui para os aspectos clínicos da doença. Paralelamente ao estabelecimento da colônia de camundongos nocautes para IL-15, utilizaremos a

técnica de silenciamento gênico por RNA de interferência carregado por vetor retroviral em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) que foram gerados a partir de camundongos como previamente descrito por Marim e colaboradores (2010). Esses ensaios serão feitos em colaboração com o grupo de trabalho do Dr. Dario S. Zamboni, do Departamento de Biologia Celular, da Escola de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto -SP. Uma das grandes vantagens deste tipo de silenciamento genico mediado por vetor retroviral é a maior estabilidade, longa duração do vetor de expressão e alta eficiência na transdução e no silenciamento gênico (Lund *et al.*, 1996; McInerney *et al.*, 2000; Pannell *et al.*, 2001; Senigl *et al.*, 2017; Mascarenha *et al.*, 2017). Assim, após a transdução, esses macrófagos serão infectados por *T. cruzi* e os índices de infecção serão avaliados.

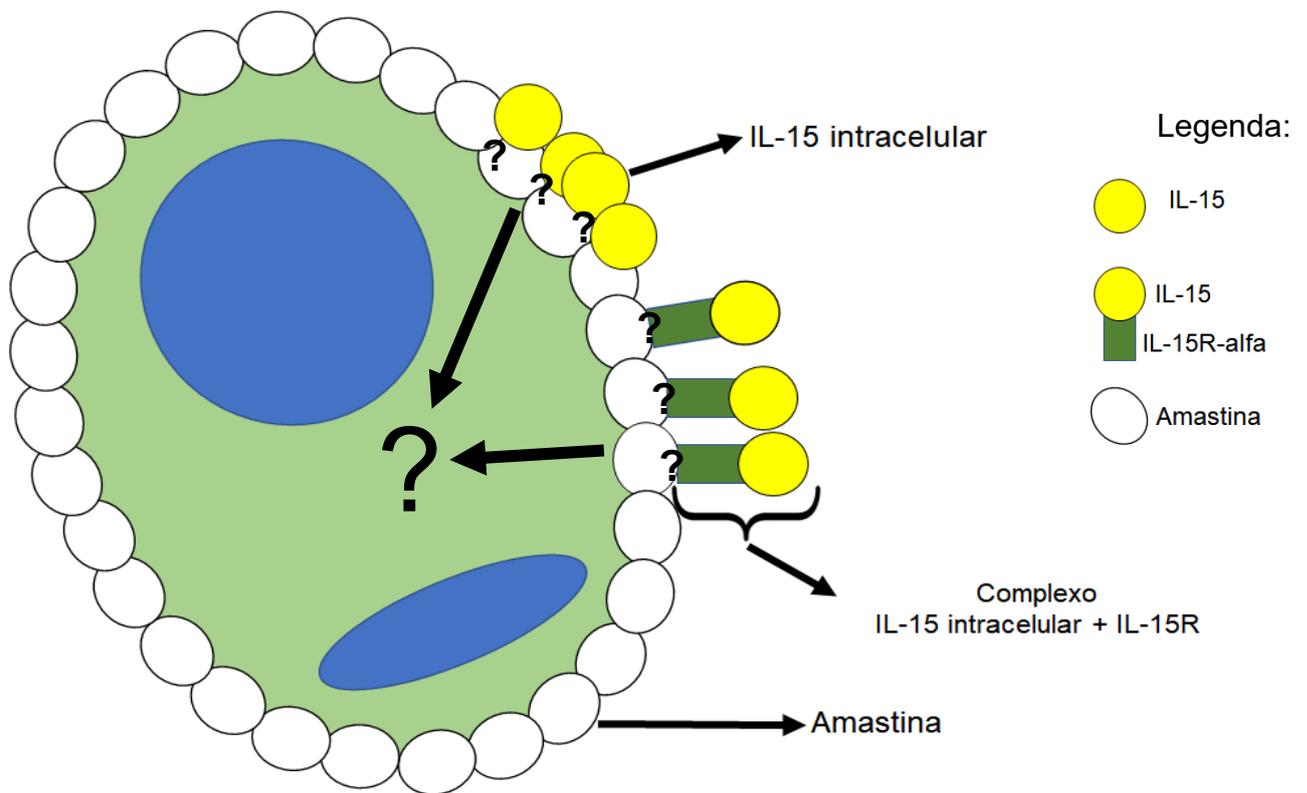


Figura 33: **Hipótese da interação de IL-15 intracelular com as amastinas presentes na superfície dos amastigotas de *T. cruzi*.** Devido a sua localização estratégica na superfície dos amastigotas, as amastinas que possuem duas alças hidrofílicas, de tamanhos diferentes, voltadas para o citoplasma da célula hospedeira; e com base nos achados nos experimentos de duplo-híbrido, que mostraram a interação da primeira alça hidrofílica das amastinas com IL-15, e também, nos experimentos de imunofluorescência, em que foram utilizados anticorpos anti-IL-15 em células infectadas por *T. cruzi*, nas quais foi possível observar uma polarização do sinal de fluorescência para IL-15 em regiões próximas aos parasitos, nós levantamos a hipótese de que as amastinas ou proteínas associadas a elas seriam utilizadas como receptor para IL-15 intracelular, que se encontra tanto ligada à cadeia alfa de alta afinidade de seu receptor heterotrimérico, como na forma descomplexada. Assim, essa ligação seria capaz de desencadear uma sinalização no próprio parasito, o que poderia, de certa forma, viabilizar a sua replicação no ambiente citoplasmático da célula hospedeira.

## 6. Perspectivas

---

Sumarizando os principais experimentos que serão realizados a fim de testar nossas hipóteses acerca da possível interação das amastinas com IL-15, e sobre o papel desta última na viabilidade do parasito no interior da célula, tem-se:

- ✓ **Ensaio de infecção *in vivo*** com *T. cruzi* de camundongos nocautes para IL-15;
- ✓ **Ensaio de infecção *in vitro*** de macrófagos com mRNA de IL-15 silenciados por RNAi;
- ✓ **Ensaio de Western Blotting** com incubação de extrato de amastigotas extracelulares com anticorpo anti-IL15
- ✓ **Ensaio de *pull-down*** com extratos celulares de células que sabidamente produzem IL-15 infectadas com *T. cruzi*,
- ✓ **Ensaio de co-immunoprecipitação** com anti-IL-15 e extratos proteicos de macrófagos ou linhagens celulares infectadas com cepas de *T. cruzi* expressando  $\delta$ -amastinas em fusão com GFP ou com Tag de HA;
- ✓ **Ensaio de infecção *in vitro* e imunofluorescência** com anti-IL-15 pós infecção de macrófagos e outras células com cepas de *T. cruzi* nocautes para  $\delta$ -amastinas por CRISPR/Cas9;
- ✓ **Ensaio de infecção *in vitro*** com *T. cruzi* de fibroblastos super-expressando IL-15;

- ✓ **Ensaio *in vitro*** com a incubação de amastigotas extracelulares, geradas *in vitro*, com IL-15 recombinante;
  
- ✓ **Ensaio de infecção *in vitro*** utilizando *Leishmania braziliensis* que tiveram as  $\delta$ -amastinas silenciadas por RNAi.

## 7. Referências bibliográficas

---

Acosta-Serrano A., Almeida I.C., Freitas-Junior L.H., Yoshida N., Schenkman S. (2001). The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. ***Molecular and Biochemical parasitology***. 114: 143-150.

Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. (1999). ***Journal of Cell Science***.112(18):2993–3002.

Allen MP, Nilsen-Hamilton M. Granzymes D, E, F, and G are regulated through pregnancy and by IL-2 and IL-15 in granulated metrial gland cells. (1998). ***J Immunol***.161:2772-2779.

Almeida, R.M. Estudos sobre a interação parasito-hospedeiro: papel das amastinas de *Trypanosoma cruzi*. **Dissertação de mestrado**. 2010.

Alpuche-Aranda, C.M., Racoosin, E.L., Swanson, J.A. and Miller, S.I. (1994). Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes, ***J. Exp. Med.***, 179, 601–8.

Alves CR, Albuquerque-Cunha JM, Mello CB, Garcia ES, Nogueira NF. (2007). *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. ***Exp Parasitol***.116: 44–52.

Alves MJ, Mortara RA. A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? (2009). ***Mem Inst Oswaldo Cruz***. 104 Suppl 1:76-88.

Aliberti J. C., Cardoso M.A., Martins G.A., Gazzinelli R.T., Vieira L.Q., Silva J.S. (1996) Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun* 64, 1961–1967.

Anderson DM, Johnson L, Glaccum MB, et al. Chromosomal assignment and genomic structure of IL-15. (1995). ***Genomics***. 25:701-706.

Andrade SG, Magalhães JB. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. (1997). **Rev Soc Bras Med Tro.** (1997). 30:27–35.

Andrews NW, Hong K, Robbins ES, Nussenzweig V. (1987). Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol.** 64: 474-484.

Andrews, N. W, Robbins E., Ley V., Nussenzweig V. Stage-specific surface antigens during the morphogenesis of *Trypanosoma cruzi*: developmentally regulated expression of a glycosyl-phosphatidylinositol anchored glycoprotein of amastigotes. (1988). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 83 Suppl 1, p. 561-562.

Angiolillo AL, Kanegane H, Sgadari C, Reaman GH, Tosato G. Interleukin-15 promotes angiogenesis in vivo. (1997). **Biochem Biophys Res Commun.** 233:231-237.

Araujo-Jorge, Tania C. de; Barbosa, Helene S. y Meirelles, Maria Nazareth L. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15-year study. (1992). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** [online]. Vol.87, suppl.5, pp.43-56.

Avicé MN, Demeure CE, Delespesse G, Rubio M, Armant M, Sarfati M. IL-15 promotes IL-12 production by human monocytes via T cell-dependent contact and may contribute to IL-12-mediated IFN- $\gamma$  secretion by CD4<sup>+</sup> T cells in the absence of TCR ligation. (1998). **J Immunol.** 161: 3408–3415.

Balknill F. (1996). **Cytokine**: A practical approach. Oxford: IRL Press.

Bamford R N, Battiata A P, Burton J D, Sharma H, Waldmann T A. Interleukin (IL) 15/IL- T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region/IL- 15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuate IL- 15 mRNA translation. (1996). **Proc Natl Acad Sci, USA.** 93:2897–2902.

Barzegar C, Meazza R, Pereno R, Pottin-Clemenceau C, Scudeletti M, Brouty-Boyé D., Doucet C., Taoufik Y., Ritz J., Musselli C., Mishal Z., Jasmin C., Indiveri F., Ferrini S, Azzarone B. (1998) IL-15 is produced by a subset of human melanomas, and is involved in the regulation of markers of melanoma progression through juxtacrine loops. **Oncogene.** 16: 2503–2512.

Bazan JF. Haemopoietic receptors and helical cytokines. (1990). *Immunol Today*. 11:350-354.

Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. (1990). *Proc Natl Acad Sci, USA*. 87:6934–6938.

Becknell B, Caligiuri MA. Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. (2005). *Adv Immunol*. 86:209–39.

Behbehani K. (1973). Developmental cycles of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas 1909) in mouse peritoneal macrophages *in vitro*. *Parasitology*. 66: 343-353.

Benchimol Barbosa PR. (2006). The oral transmission of Chagas' disease: na acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int J Cardiol*. 112: 132-133.

Bergamaschi C., Jalah R., Kulkarni V., Rosati M., Zhang G.M., Alicea C., Zolotukhin A.S., Felber B.K., Pavlakis G.N. Secretion and biological activity of short signal peptide IL-15 is chaperoned by IL-15 receptor alpha *in vivo*. (2009). *J Immunol*. 183:3064–3072.

Boscardin S.B., Torrecilhas A.C., Manarin R., Revelli S., Rey E.G., Tonelli RR, Silber AM. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. (2010). *J. Cell Mol. Med*. 14(6B):1373–1384.

Bouchard A., Ratthé C., Girard D. Interleukin-15 delays human neutrophils apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8. (2004). *J Leukoc Biol*. 75:893–900.

Brandonisio O., M.A., Panaro M. Sisto, Acquafredda A., Fumaro L., and Leogrande D. (2000). Interactions between *Leishmania* parasites and host cells. *Parassitologia*. 42:183-190.

Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (2000) *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. (2000) 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 431p.

Brener, Z. & Chiari, E. Aspects of early growth of different *Trypanosoma cruzi* strains in culture medium. (1965). *Journal Parasitology*. 51:922-926.

Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. ***Annu Rev Microbiol.*** 27: 347-382.

Brown H.F., Wang L., Khadka S., Fields S., LaCount D.J. (2011). A densely overlapping gene fragmentation approach improves yeast two-hybrid screens for *Plasmodium falciparum* proteins. ***Mol Biochem Parasitol.*** 178:56–59.

Budagian V, Bulanova E, Orinska Z et al. Natural soluble interleukin-15Ralpha is generated by cleavage that involves the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17). (2004). ***J Biol Chem.*** 279:40368–75.

Budagian V., Bulanova E., Paus R., Bufone-Paus S. (2006). IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. ***Cytokine & Growth Factor Reviews.*** 17(4):259–280.

Bulfone-Paus S., Durkop H., Paus R., Krause H., Pohl T., Onu A. (1997). Differential regulation of human T lymphoblasts functions by IL-2 and IL-15. ***Cytokine.*** 9:507–13.

Burton J.D., Bamford R.N., Peters C., Grant A.J., Kurys G., Goldman C.K., Brennan J., Roessler E., Waldmann T.A. (1994). A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. ***Proc Natl Acad Sci, USA.*** 91:4935–9.

Buscaglia C. A., Campo V. A., Frasch A. C., Di Noia J. M. (2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. ***Nat. Rev. Microbiol.*** 4(3)229–236.

Buscaglia C.A., Campo V.A., Di Noia J.M., Torrecilhas A.C., De Marchi C.R., Ferguson M.A., Frasch A.C., Almeida I.C. (2004) The surface coat of the mammal-dwelling infective trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* is formed by highly diverse immunogenic mucins. ***J Biol Chem.*** 279:15860-15869.

Camara Coelho, L.I., Paes, M., Guerra, J.A., et al. (2011). Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil, ***Parasitol. Res.*** 108, 671–7.

Cançado JR (1999). Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benznidazole. In Z Brener & Z Andrade (eds), *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro (in press).

Carvalho U. de T.M., De Souza W. (1986). Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop, São Paulo**. 28: 205-212.

Cassatella M.A., McDonald P.P. (2000). Interleukin-15 and its impact on neutrophil function. **Curr Opin Hematol**. 7:174–7.

Castro D.P., Seabra S.H., Garcia E.S., de Souza W., Azambuja P. (2007). *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. **Exp Parasitol**. 117:201–207.

Cestari I.; Ansa-Addo E., Deolindo P., Inal J. M., Ramirez M. I. (2012). *Trypanosoma cruzi* Immune Evasion Mediated by Host Cell-Derived Microvesicles. **The Journal of Immunology**. v. 188, p. 1942-1952.

Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro (1909): Guanabara Koogan.

Chandra D., Naik S. (2008). *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. **Clin. Exp. Immunol**. 154, 224–234.

Chirifu M., Hayashi C., Nakamura T., Toma S., Shuto T., Kai H., Yamagata Y., Davis S.J., Ikemizu S. (2007). Crystal structure of the IL-15-IL-15R alpha complex, a cytokine-receptor unit presented in trans. **Nat Immunol**. 8:1001–7.

Christensen SM, Dillon LA, Carvalho LP, Passos S, Novais FO, Hughitt VK, et al. (2016). Meta-transcriptome Profiling of the Human-*Leishmania braziliensis* Cutaneous Lesion. **PLoS Negl Trop Dis**. 3;11(5).

Cosman D. (1993). The hematopoietin receptor superfamily. **Cytokine**. 5:95–106.

Coughlin BC, Teixeira SM, Kirchhoff LV, Donelson JE. (2000). Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-

dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. **J Biol Chem.** 275(16):12051–60.

Cribb P, Serra E. (2009). One- and two-hybrid analysis of the interactions between components of the *Trypanosoma cruzi* spliced leader RNA gene promoter binding complex. **Int J Parasitol.** 39:525–532.

Cruz MC, Souza-Melo N, da Silva CV, Darocha WD, Bahia D, et al. (2012). *Trypanosoma cruzi*: role of delta-amastin on extracellular amastigote cell invasion and differentiation. **PLoS One.** 7:12.

Cuervo, H.; Guerrero, N. A.; Carbajosa, S.; Beschin, A.; Baetselier, P.; Gironès, N.; Fresno, M. (2011). Myeloid-Derived Suppressor Cells Infiltrate the Heart in Acute *Trypanosoma cruzi* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 187, p. 2656- 2665.

D'Agostino P, Milano S, Arcoleo F, Di Bella G, La Rosa M, Ferlazzo V, et al. (2004). Interleukin-15, as interferon-gamma, induces the killing of *Leishmania infantum* in phorbol-myristate-acetate-activated macrophages increasing interleukin-12. **Scand J Immunol.** 60:609–14.

DaRocha W.D., Otsu K., Teixeira S.M.R., Donelson J.E. (2004). Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology.** 133: 175-186.

DaRocha WD, Bartholomeu DC, Macedo CD, Horta MF, Cunha-Neto E, Donelson JE, Teixeira SM. (2002). Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **Parasitol Res.** 88: 292-300.

Dias J. C. P. & Coura J. R. (1997). Controle da doença de Chagas. Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral. 453-468, Rio de Janeiro: **Editores Fiocruz.**

DeOliveira F.A., de, Barreto A.S., Bomfim L.G., Leite T.R., Dos Santos P.L., et al. (2015) Soluble CD40 Ligand in Sera of Subjects Exposed to *Leishmania infantum* Infection Reduces the Parasite Load in Macrophages. **PLoS One.** 10:e0141265.

Dias J.C.P., Coura J.R. (1997). Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral [online]. Rio de Janeiro: **Editores FioCruz.**

Dillon L.A., Suresh R., Okrah K., Corrada Bravo H., Mosser D.M., El-Sayed N.M. (2015). Simultaneous transcriptional profiling of *Leishmania major* and its murine macrophage host cell reveals insights into host-pathogen interactions. ***BMC Genomics***. 16:1108.

Ding A.H., Nathan C.F., Stuehr D.J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. ***J. Immunol.*** 141:2407–2412.

Doherty TM, Seder RA, Sher A. (1996). Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. ***J Immunol.*** 156:735-741.

Dubois S., Magrangeas F., Lehours P., et al. (1999). Natural splicing of exon 2 of human interleukin-15 receptor alpha-chain mRNA results in a shortened form with a distinct pattern of expression. ***J Biol Chem.*** 274:26978-26984.

Dubois S., Mariner J., Waldmann TA., Tagaya Y. (2002). IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. ***Immunity***.17:537–547.

Dubois S.P., Waldmann T.A., Muller J. (2005). Survival adjustment of mature dendritic cells by IL-15. ***Proc Natl Acad Sci, USA.*** 102:8662–7.

Duitman E. H., Orinska Z., Bulanova E., Paus R. & Bulfone-Paus S. (2008). How a cytokine is chaperoned through the secretory pathway by complexing with its own receptor: lessons from interleukin-15 (IL-15)/IL-15 receptor alpha. ***Mol Cell Biol.*** 28:4851–4861.

El-Sayed N.M., Myler P.J., Bartholomeu D.C., Nilsson D., Aggarwal G., et al. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. ***Science***. 309: 409–415.

Escudero-Hernández C., Plaza-Izurieta L., Garrote J. A., Bilbao J. R., CEGEC, Arranz E. (2017). Association of the IL-15 and IL-15R $\alpha$  genes with celiac disease. ***Cytokine***. 99:73-79.

Espinoza B, Rico T., Sosa S., Oaxaca E., Vizcaino-Castillo A., Caballero M.L., et al. (2010). Mexican *Trypanosoma cruzi* *T. cruzi* I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection mode. **J Biomed Biotechnol.** 2010:890672.

Evans, V. J., Kerr, H. A., McQuilkin, W. T., Earle, W. R., and Hull, R. N. (1959). Growth in vitro of a long-term strain of monkey kidney cells in medium NCTC 109 free of any added protein. **Am. J.** 70:297-302.

Fawaz LM, Sharif-Askari E, Menezes J. Up-regulation of NK cytotoxic activity via IL-15 induction by different viruses: a comparative study. (1999). **J Immunol.** 163: 4473–80.

Fehniger T.A., Suzuki K., Ponnappan A., et al. (2001). Fatal leukemia in interleukin-15 transgenic mice follows early expansions in NK and memory-phenotype CD81 T cells. **J Exp Med.** 193(2):219-31.

Fehniger T.A., Caligiuri M.A. (2001). Interleukin 15: biology and relevance to human disease. **Blood.** 97:14–32.

Fernandes M.C., Andrews N.W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. (2012). **FEMS Microbiol Rev.** 36(3):734–47.

Fernandes M.C., Dillon L.A., Belew A.T., Bravo H.C., Mosser D.M., El-Sayed N.M. (2016). Dual Transcriptome Profiling of Leishmania-Infected Human Macrophages Reveals Distinct Reprogramming Signatures. **M Bio.** (3): e00027-16.

Fields, S.; Song, O. (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions" (abstract). **Nature**, London. V. 340, n. 6230, p. 245-246.

Flamand L., Stefanescu I., Menezes J. (1996). Human Herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. **J. Clin. Invest.** 97(6): 1373-1381.

Fonseca S.G., Reis M.M., Coelho V., Nogueira L.G., Monteiro S.M., Maicarena E.C., Bacal F., Bocchi E., Guilherme L., Zheng X.X., Liew F.Y., Higuchi M.L., Kalil J., Cunha-Neto E. (2007). Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8+ T cells at heart lesions of human chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Scandinavian Journal of Immunology.** 66: 362-371.

Freitas L. M., dos Santos S.L., Rodrigues-Luiz G.F., Mendes T.A., Rodrigues T.S., Gazzinelli R.T., Teixeira S.M., Fujiwara R.T., Bartholomeu D.C. (2011) Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. **PLoS One**. 6(10).

Fu J., Gao J., Pi R., Liu P. (2005). An optimized protocol for culture of cardiomyocyte from neonatal rat. **Cytotechnology**. 49(2-3):109–116.

Fu Z., Gilbert E.R., Liu D. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. **Curr Diabetes Rev**. 9:25–53.

Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K., Tsukita S. (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. **J Cell Biol**. 141: 1539–1550.

Gaffen S.L., Goldsmith M.A., Green W.C. (1998). Interleukin-2 and the interleukin-2 receptor. San Diego: **Proc Natl Acad Sci**, USA. 15;89(6):2165-9.

Gaggero A., Azzarone B., Andrei C., Mishal Z., Meazza R., Zappia E. (1999). Differential intracellular trafficking, secretion and endosomal localization of two IL-15 isoforms. **Eur J Immunol**. 29:1265–74.

Galli S.J., Nakae S., Tsai M. (2005). Mast cells in the development of adaptive immune responses. **Nat Immunol**. 6:135–42.

Garcia E. S., Ratcliffe N. A., Whitten M. M., Gonzalez M. S., Azambuja P. (2007). Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. **Journal of Insect Physiology**. 53(1):11–21.

Gazzinelli R. T.; Oswald, I. P.; Hieny, S.; James, S. L. & Sher, A. (1992). The microbicidal activity of IFN- $\gamma$ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by IL-10 and TGF- $\beta$ . **European Journal of Immunology**. 22:2501-2506.

Girard D., Boiani N., Beaulieu A.D. (1998). Human neutrophils express the interleukin-15 receptor alpha chain (IL-15Ralpha) but not the IL-9Ralpha component. **Clin Immunol Immunopathol**. 88: 232-240.

Girard D., Paquet M.E., Paquin R., Beaulieu A.D. (1996). Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. **Blood**. 88: 3176-3184.

Giri J.G., Ahdieh M., Eisenman J., et al. (1994). Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. **EMBO J**. 13: 2822-2830.

Giri J.G., Kumaki S., Ahdieh M., Friend D.J., Loomis A., Shanabeck K., et al. (1995). Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the  $\alpha$  chain of the IL-2 receptor. **EMBO J**. 14:3654–63.

Goebel J., Forrest K., Morford L., Roszman T.L. (2002). Differential localization of IL-2- and -15 receptor chains in membrane rafts of human T cells. **J Leukoc Biol**. 72:199–206.

Grabstein K.H., Eisenman J., Shanebeck K., Rauch C., Srinivasan S., Fung V., et al. (1994). Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. **Science**. 264: 965–8.

Green L.C., Wagner D.A., Wlogowski K., Skipper P.L., Wishnok J.S., Wannenbaum S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem**. 126:131–138.

Guo Y LL, Patil NK, et al. (2017) Immunobiology of the IL-15/IL-15R $\alpha$  complex as an antitumor and antiviral agent. **Cytokine and Growth Factor Reviews**. 10.1016.

Gürtler R.E., Segura E.L., Cohen J.E. (2003) Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. **Emerg Infect Dis**. 9: 29-32.

Gutierrez, Fredy R.S. (2011). Control of Innate and Adaptive Immune Responses during Infectious Diseases. **Libgen Librarian**. (Chapter 4. pp.69-84).

Hanisch U-K., Lyons S.A., Prinz M., Nolte C., Weber J.R., Kettenmann H., et al. (1997). Mouse brain microglia express interleukin-15 and its multimeric receptor complex functionally coupled to Janus kinase activity. **J Biol Chem**. 272:28853–60.

Higuchi Mde L., Benvenuti L. A., Martins Reis M., Metzger M. (2003). Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovascular Research**. 60(1):96–107.

Hoontrakoon R., Chu W.H., Gardai S.J., Wenzel S.E., McDonald P., Fadok V.A., et al. (2002). Interleukin-15 inhibits spontaneous apoptosis in human eosinophils via autocrine production of granulocyte macrophage- colony stimulation factor and nuclear factor-kB activation. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 26:404–12.

Houston-Ludlam G.A., Belew A.T., El-Sayed N.M. (2016). Comparative Transcriptome profiling of human foreskin fibroblasts infected with the Sylvio and Y strains of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**. 9;11(8):e0159197.

Hsu PD, Lander ES, Zhang F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. **Cell**. 157: 1262–1278.

Huang S., Chen J., Chen Q., Wang H., Yao Y., Chen J., Chen Z. (2013). A second CRM1-dependent nuclear export signal in the influenza A virus NS2 protein contributes to the nuclear export of viral ribonucleoproteins. **J Virol**. 87:767–778.

Hull, R. N., Cherry, W. R., Johnson, I. S. (1956). The adaption and maintenance of mammalian cells to continuous growth in tissue culture, **Anat. Rec**. 124, 490.

Hurt J., Thibodeau S., Hirsh A., Pabo C., Joung J. (2003). “Highly specific zinc finger proteins obtained by directed domain shuffling and cellbased selection”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington. v. 100, n. 21, p. 12271- 12276.

Ivens A.C., Peacock C.S., Worthey E.A., Murphy L., Aggarwal G., Berriman M., Sisk E., Rajandream M., Adlem E., Aert R., Anupama A., Apostolou Z., Attipoe P., Bason N., Bauser C., Beck A., Beverley S.M., Biachettin G., Borzym K., Bothe G., Bruschi C.V., Collins M., Cadag E., Ciarloni L., Clayton C., Coulson R.M.R., Cronin A., Cruz A.M., Davies R.M., Gaudenzi J.D., Dobson D.E., Dueterhoeft A., Fazelina G., Fosker N., Frasch A.C., Fraser A., Fuchs M., Gabel C., Goble A., Goffeau A., Harris D., Hertz-Fowler C., Hilbert H., Horn D., Huang Y., Klages S., Knights A., Kube M., Larke N., Litvin L., Lord A., Louie T., Marra M., Masuy D., Matthews K., Michaeli S., Mottram J.C., Müller-Auer S., Munden S., Nelson S., Norbertczak H., Oliver K., O'Neil S., Pentony M., Pohl T.M., Price C., Purnelle B., Quail M.A., Rabinowitsch E., Reinhardt R., Rieger M., Rinta J., Robben J., Robertson L., Ruiz J.C., Rutter S., Saunders D., Schäfer M., Schein J., Schwartz D.C., Seeger K., Seyler A., Sharp S., Shin H., Sivam D., Squares R., Squares S., Tosato V., Vogt C., Volckaert G., Wambutt R., Warren T., Wedler H., Woodward J., Zhou S., Zimmermann W., Smith D.F., Blackwell J.M., Stuart K.D., Barrell B., Myler P.J.

(2005). The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. **Science**. 309(5733): 436-442.

Ito T., Chiba T., Ozawa R., Yoshida M., Hattori M., Sakaki Y. "A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome." (2001). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 98:4569–4574.

Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. **Crit Rev Immunol**. 2012; 32(1).

Jackson P.A. (2010). The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. **Mol. Biol. Evo.** 27(1): 33-45.

James P., Halladay J., Craig E. A. (1996). "Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast." **Genetics**. vol. 144, no. 4, pp. 1425–1436.

Johnston J.A., Bacon C.M., Finbloom D.S., Rees R.C., Kaplan D., Shibuya K., et al. (1995). Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. **Proc Natl Acad Sci, USA**. 92:8705–9.

Joung J., Ramm E., Pabo C. (2000). "A bacterial twohybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington. V. 97, n. 13, p. 7382-7387.

Junqueira, C., Caetano, B., Bartholomeu, D. C., Melo, M. B., Ropert, C., Rodrigues, M. M., et al. (2010). The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Rev. Mol. Med.**15;12:e29.

Kahn S., Colbert T.G., Wallace J.C., Hoagland N.A., Eisen H. (1991). The major 85-kDa surface antigen of the mammalian-stage forms of *Trypanosoma cruzi* is a family of sialidases. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 88: 4481-4485.

Kangussu-Marcolino M. M., De Paiva R. M. C., Araújo P. R., et al. (2013). Distinct genomic organization, mRNA expression and cellular localization of members of two amastin sub-families present in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiology**. 17;13:10.

Keegan L., Gill G., and Ptashne M. (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. **Science**. 231, 699–704.

Kennedy M.K, et al. (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. **J Exp Med**. 191:771–780.

Kennedy M.K., Glaccum M., Brown S.N., Butz E.A., Viney J.L., Embers M., et al. (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. **J Exp Med**. 6;191(5):771-80.

Kimes B.W., Brandt B.L., (1976). Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. **Exp Cell Res**. 98:367–381.

Kipnis T. L., Krettli A. U., Dias da Silva W. (1985). Transformation of trypomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway by immune IgG fragments. *Scan. J. Immunol.* 22(2): 217-226.

Kipnis T. L., Tambourgi D. V., Sucupira M., Dias Da Silva W. (1986). Effect of membrane components on the formation of the classical path C3 convertase. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 19, p. 271-278.

Kobayashi H., Dubois S., Sato N., Sabzevari H., Sakai Y., Waldmann T.A., et al. (2005). Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. **Blood**. 105:721–7.

Koo S-j, Chowdhury IH, Szczesny B, Wan X, Garg NJ. (2016). Macrophages promote oxidative metabolism to drive nitric oxide generation in response to *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**. 84:3527–41.

Kurowska M, RudnickaW, Maslinska D, Maslinski W. (2002). Expression of IL-15 and IL-15 receptor isoforms in select structures of human fetal brain. *Ann N Y Acad Sci*. 966:441–5.

Kurys G., Tagaya Y., Bamford R., Hanover J.A., Waldmann T.A. (2000). The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15. **J Biol Chem**. 275:30653–9.

Lee Y.B., Satoh J., Walker D.G., Kim S.U. (1996). Interleukin- 15 gene expression in human astrocytes and microglia in culture. **Neuroreport**. 7:1062- 1066.

Leonard W.J., Shores E.W., Love P.E. (1995). Role of the common cytokine receptor gamma chain in cytokine signaling and lymphoid development. **Immunol Rev**. 148:97-114.

Leonard W.J. (2001). Role of JAK kinases and STATs in cytokine signal transduction. **Int J Hematol**. 73:271–7.

Li Y., et al. (2016). Transcriptome Remodeling in Trypanosoma cruzi and Human Cells during Intracellular Infection. **PLoS Pathog**. 5;12(4):e1005511.

Lima M.F., Beltz L.A., Kierszenbaum F. (1988). Trypanosoma cruzi: a specific surface marker for the amastigote form. **J Protozool**. 35: 108-110.

Lin Y., Li Y., Zhu Y., Zhang J., Li Y., Liu X., Jiang W., Yu S., You X-F., Xiao C., et al. (2012). Identification of antituberculosis agents that target ribosomal protein interactions using a yeast two-hybrid system. **Proc Natl Acad Sci**.109(43):17412–7.

Liu T., Nishimura H., Matsugushi T., Yoshikai Y. (2000). Differences in interleukin-12 and -15 production by dendritic cells at the early stage of Listeria monocytogenes infection between BALB/c and C57 BL/6 mice. **Cell Immunol**. 202:31–40.

Lodolce J.P., Boone D.L., Chai S., et al. (1998) IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. **Immunity**. 9:669-676.

Lorenzen I., Dingley A.J., Jacques Y., Grotzinger J. (2006). The structure of the interleukin-15 alpha receptor and its implications for ligand binding. **J Biol Chem**. 281: 6642–6647.

Louch W., Sheehan K., Wolska B. (2001). Methods in cardiomyocyte isolation culture, and gene transfer. **J Mol Cell Cardiol**. 51:288–298.

Low H.P., Santos M.A., Wizel B., Tarleton R.L. (1998). Amastigote surface proteins of *Trypanosoma cruzi* are targets for CD8+ CTL. **J Immunol.** 160(4):1817–1823

Lund A.H., Duch M., Pedersen F.S. (1996). Transcriptional silencing of retroviral vectors. **J Biomed Sci.** 3:365–378.

Ma A., Koka R., Burkett P. (2006). Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. **Annu Rev Immunol.** 24:657–79.

Ma J., Ptashne M. (1987). Detection analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. **Cell**, Cambridge. v. 48, p. 847-853.

Maeurer M., Seliger B., Trinder P., Gerdes J., Seitzer U. (1999). Interleukin-15 in mycobacterial infection of antigen-presenting cells. **Scand. J. Immunol.** 50: 280-288.

Maeurer M.J, Trinder P., Hommel G., Walter W., Freitag K., Atkins D., et al. (2000). Interleukin-7 or interleukin-15 enhances survival of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. **Infect Immun.** 68:2962–70.

Marim F.M., Silveira T.N., Lima D.S. Jr., Zamboni D.S. (2010). A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PLoS One.** 17;5(12):e15263.

Mascarenhas D.P.A., Cerqueira D.M., Pereira M.S.F., Castanheira F.V.S., Fernandes T.D., Manin G.Z., Cunha L.D., Zamboni D.S. (2017). Inhibition of caspase-1 or gasdermin-D enable caspase-8 activation in the Naip5/NLRC4/ASC inflammasome. **PLoS Pathog.** 3;13(8):e1006502.

Massad E. (2008). The elimination of CD from Brazil. **Epidemiol. Infect.** 136: 1153–1164.

Masuda A., Matsuguchi T., Yamaki K., et al. (2000). Interleukin-15 induces rapid tyrosine-phosphorylation of STAT6 and the expression of interleukin-4 in mouse mast cells. **J Biol Chem.** 275:29331- 29337.

Masuda A., Matsuguchi T., Yamaki K., Hayakawa T., Yoshikai Y. (2001). Interleukin-15 prevents mouse mast cell apoptosis through STAT6-mediated Bcl-xL expression. **J Biol Chem.** 276:26107–13.

Matsumoto T.K., Hoshino-Shimizu S., Nakamura P.M., Andrade H.F. Jr, Umezawa E.S. (1993). High resolution of *Trypanosoma cruzi* amastigote antigen in serodiagnosis of different clinical forms of Chagas' disease. **J Clin Microbiol.** 1486–1492.

Mattei F., Schiavoni G., Belardelli F., Tough D.F. (2001). IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysacchride and promotes dendritic cell activation. **J Immunol.** 167:1179–87.

McDonald P.P., Russo M.P., Ferrini S., Cassatella M.A. (1998). Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. **Blood.** 92:4828-4835.

McInerney J.M., Nawrocki J.R., Lowrey C.H. (2000) Long-term silencing of retroviral vectors is resistant to reversal by trichostatin A and 5-azacytidine. **Gene Ther.** 7: 653–663.

Meazza R., Verdiani S., Biassoni R., Coppolecchia M., Gaggero A., Orengo AM, et al. (1996). Identification of a novel interleukin-15 (IL-15) transcript isoform generated by alternative splicing in human small cell lung cancer cell lines. **Oncogene.** 12:2187–92.

Meleppattu S., Kamus-Elimeleh D., Zinoviev A., Cohen-Mor S., Orr I., Shapira M. (2015). The eIF3 complex of *Leishmania* -subunit composition and mode of recruitment to different cap-binding complexes. **Nucleic Acids Res.** 43:6222-35.

Milano S., Di Bella G., D'Agostino P., Barbera C., Caruso R., La Rosa M., Ferlazzo V., Vitales G., La Russa C., Gambino G., Chifari N., Mansueto S., Cillari E. (2002). IL-15 in human visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. **Clin. Exp. Immunol.** 127:360-365.

Miles M.A., Cedillos R.A., Póvoa M.M., de Souza A.A., Prata A., Macedo V. (1981). Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? **Lancet** (London, England). 1:1338–1340.

Ministério Da Saúde, **Governo Federal**. Doença de Chagas. Disponível em <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas>, último acesso em 11 de dezembro de 2017.

Miyazaki Y., Hamano, S., Wang S., Shimanoe Y., Iwakura Y., Yoshida H. (2010). IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. ***The Journal of Immunology***. v. 185, p. 1150-1157.

Mody C.H., Spurrell J.C.L., Wood C.J. (1998). Interleukin-15 induces antimicrobial activity after release by *Cryptococcus neoformans*-stimulated monocytes. ***The Journal of Infectious Diseases***. 178: 803-814.

Moresco J. J., Carvalho P. C., Yates III J. R. (2010). "Identifying components of protein complexes in *C. elegans* using co-immunoprecipitation and mass spectrometry," ***Journal of Proteomics***. vol. 73, no. 11, pp. 2198–2204.

Mortier E., Bernard J., Plet A., Jacques Y. (2004). Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor alpha-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist. ***J Immunol***. 173: 1681–1688.

Muñoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M. (1992). Synergism of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through nitric oxide dependent mechanism Eur. ***J Immunol***. 22:301–307.

Musso T., Calosso L., Zucca M., et al. (1999). Human monocytes constitutively express membranebound, biologically active, and interferon-gammaupregulated interleukin-15. ***Blood***. 93:3531- 3539.

Neely G.G., Epelman S., Ma L.L., Colarusso P, Howlett C.J., Amankwah E.K., McIntyre A.C., Robbins S.M, Mody C.H. (2004). Monocyte surface-bound IL-15 can function as an activating receptor and participate in reverse signaling. ***The Journal of Immunology***.172:4225–4234.

Németh T., Toth A., Hamari Z., Falus A., Eder K., Vagvolgyi C., Guimaraes A.J., Nosanchuk J.D., Gacser A. (2014). Transcriptome profile of the murine macrophage cell response to *Candida parapsilosis*. ***Fungal Genet. Biol.*** 65:48–56.

Nguyen K.B., Salazar-Mather T.P., Dalod M.Y. et al. (2002). Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. ***J Immunol***. 169:4279–87.

Nilsen E.M. Johansen F-E., Jahnsen F.L., Lundin K.E., Scholz T., Brandtzaeg P., et al. (1998). Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine. **Gut**. 42:635–42.

Nishimura H., Yajima T., Naiki Y., Tsunobuchi H., Umemura M., Itano K., et al. (2000). Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo. **J Exp Med**. 191:157–69.

Nogueira N.F., Gonzalez M.S., Gomes J.E, de Souza W., Garcia E.S., Azambuja P., et al. (2007). Trypanosoma cruzi: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of Rhodnius prolixus. **Exp Parasitol**.116:120–8.

Nogueira N., & Cohn Z. A. (1978). Trypanosoma cruzi: in vitro induction of macrophage microbicidal activity. **J. Exp. Med**. 148:288.

Nogueira N.F., Gonzalez M.S., Gomes J.E, de Souza W., Garcia E.S., Azambuja P., et al. (2007). Trypanosoma cruzi: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of Rhodnius prolixus. **Exp Parasitol**.116:120–8.

Nogueira, R. T. *et al.* (2011). Biological and immunological characterization of recombinant Yellow Fever 17D Viruses expressing a *Trypanosoma cruzi* Amastigote Surface Protein-2 CD8+ T cell epitope at two distinct regions of the genome. **Virology** v. 8, p. 127.

Nowell M.A., Richards P.J., Horiuchi S., Yamamoto N., Rose-John S., Topley N., et al. (2003). Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. **J Immunol**. 171(6):3202–9.

Ogata Y., Kukita A., Kukita T., Komine M., Miyahara A., Miyazaki Z., et al. (1999). A novel role of IL-15 in the development of osteoclasts: inability to replace its activity with IL-2. **J Immunol**. 162: 2754–60.

Oh S. Perera L.P., Terabe M., Ni L., Waldmann T.A., Berzofsky JA. (2008). IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. **Proc Natl Acad Sci, USA**. 105:5201–5206.

Ohteki T., Suzue K., Maki C., Ota T., Koyasu S. (2001). Critical role of IL-15-IL-15R for antigen-presenting cell functions in the innate immune response. **Nat Immunol**. 2: 1138–1143.

Ohteki T., Yoshida H., Matsuyama T., Duncan G.S., Mak T.W., Ohashi P.S. (1998). The transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1) is important during the maturation of natural killer 1.11 T cell receptor- alpha/beta1 (NK11 T) cells, natural killer cells, and intestinal intraepithelial T cells. **J Exp Med.** 187:967-972.

Ottonello L., Frumento G., Arduino N., Bertolotto M., Dapino P., Mancini M., et al. (2002). Differential regulation of spontaneous and immune complex-induced neutrophil apoptosis by proinflammatory cytokines. Role of oxidants, Bax and caspase-3. **J Leukoc Biol.** 72:125–32.

Ouyang S., Hsueh H., Kastin A.J., Pan W. (2013). TNF stimulates nuclear export and secretion of IL-15 by acting on CRM1 and ARF6. **PLoS One.** 7;8(8):e69356.

Paiva R.M.C. de, Grazielle-Silva V., Cardoso M.S., Nakagaki B.N., Mendonça-Neto R.P., Canavaci A.M.C., Souza Melo N., Martinelli P.M., Fernandes A.P., daRocha W.D., Teixeira S.M.R. (2015). Amastin knockdown in *Leishmania braziliensis* affects parasite-macrophage interaction and results in impaired viability of intracellular amastigotes. **PLoS Pathog.** 7;11(12):e1005296.

Pan S.C.T. (1978). *Trypanosoma cruzi*: *In vitro* interactions between cultured amastigotes and human skin muscle cells. **Exp Parasitol.** 45: 274-286.

Pannell D., Ellis J. (2001). Silencing of gene expression: Implications for design of retrovirus vectors. **Rev. Med. Virol.** 11:205–217.

Peacock C.S., Seeger K., Harris D., Murphy L., Ruiz J.C., Quail M.A., Peters N., Adlem E., Tivey A., Aslett M., Ivens A., Fraser A., Rajandream M., Carver T., Norbertczak H., Chillingworth T., Hance Z., Jagels K., Moule S., Ormond D., Rutter S., Squares R., Whitehead S., Rabinowitsch E., Arrowsmith C., White B., Thurston S., Bringaud F., Baldauf S.L., Faulconbridge A., Jeffares D., Depledge D.P., Oyola S.O., James D. (2007) Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nat Genet.** 39:839–847.

Pelletier M., Rathé C., Girard D. (2002). Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase-1/2. **FEBS Lett.** 532:164–70.

Pena I., Pilar Manzano M., Cantizani J., et al. (2015). New Compound Sets Identified from High Throughput Phenotypic Screening against Three Kinetoplastid Parasites: An Open Resource. **Sci. Rep.** 5, 8771.

Pereno R., Giron-Michel J., Gaggero A., Cazes E., Meazza R., et al. (2000) IL-15/IL-15R alpha intracellular trafficking in human melanoma cells and signal transduction through the IL-15Ralpha. **Oncogene.** 19: 5153–5162.

Perkins S.J., Haris P.I., Sim R.B., Chapman D. (1988). A study of the structure of human complement component factor H by Fourier transform infrared spectroscopy and secondary structure averaging methods. **Biochemistry.** 27:4004–12.

Peter A.K., Bjerke M.A., Leinwand L.A. (2016). Biology of the cardiac myocyte in heart disease. **Mol Biol Cell.** 15;27(14):2149-60.

Pettit D.K., Bonnert T.P., Eisenman J., et al. (1997). Structure-function studies of interleukin 15 using sitespecific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modeling. **J Biol Chem.** 272:2312-2318.

Postan M., et al. (1983). Studies of *Trypanosoma cruzi* Clones in Inbred Mice: I. A Comparison of the Course of Infection of C3H/HEN- Mice with Two Clones Isolated from a Common Source. **Am J Trop Med Hyg.** 32:497–506.

Prinz M., Hanisch U.K., Kettenmann H., Kirchhoff F. (1998) Alternative splicing of mouse IL-15 is due to the use of an internal splice site in exon 5. **Brain Res Mol Brain Res.** 63:155-162.

Quinn L.S., Haugk K.L., Grabstein K.H. (1995). Interleukin- 15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. **Endocrinology.** 136:3669-3672.

Rao, V. S., Srinivas, K., Sujini, G. & Kumar, G. (2014). Protein-protein interaction detection: methods and analysis. **Int J Proteomics.** 2014:147648.

Rappl G., Kapsokefalou A., Heuser C., Rossler M., Ugurel S., Tilgen W., et al. (2001). Dermal fibroblasts sustain proliferation of activated T cells via membrane-bound interleukin-15 upon long-term stimulation with tumor necrosis factor- $\alpha$ . **J Invest Dermatol.** 116:102–9.

Real, F. *et al.* (2013). The genome sequence of Leishmania (Leishmania) amazonensis: functional annotation and extended analysis of gene models. **DNA Res.** 20, 567–581.

Real, F., Mortara, R.A. and Rabinovitch, M. (2010) Fusion between Leishmania amazonensis and Leishmania major parasitophorous vacuoles: live imaging of coinfecting macrophages, **PLoS Negl. Trop. Dis.** 4, e905.

Real, F., Pouchelet, M. and Rabinovitch, M. (2008) Leishmania (L.) amazonensis: fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone-marrow derived mouse macrophages. **Exp. Parasitol.** 119, 15–23.

Reed S. G., Nathan C. F., Pihl D. L., Rodrick S. P., Shanebeck K., Conlon P. J., Grabstein K. H. (1987). Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit Trypanosoma cruzi and release hydrogen peroxide. **Journal of Experimental Medicine.** 166:1734-1746.

Revollo S., Oury B., Laurent J.P., Barnabe C., Quesney V., Carriere V., Noel S., Tibayrenc M. (1998). Trypanosoma cruzi: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. **Exp. Parasitol.** 89: 30–39.

Rittig M.G., Bogdan C. (2000). Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitol Today.** 16:292–297.

Rochette A., McNicoll F., Girard J., Breton M., Leblanc E., Bergeron M.G., Papadopoulou B. (2005). Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in Leishmania spp. **Molecular and Biochemical Parasitology.** 140: 205-220.

Rodrigues J.C., Godinho J.L., de Souza W. (2014). Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, life cycle and ultrastructure. **Subcell Biochem.** 74:1–42.

Roffé E., Rothfuchs A. G., Santiago H. C., Marino A. P., Ribeiro-Gomes F. L., Eckhaus M., *et al.* (2012). IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of Trypanosoma cruzi infection. **J. Immunol.** 188, 649–660.

Rose-John S., Scheller J., Elson G., Jones S.A. (2006). Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol.* 80: 227–236

Rückert R., Asadullah K., Seifert M., Budagian V., Arnold R., Trombotto C., et al. (2000). Inhibition of keratinocyte apoptosis by IL-15: a new parameter in the pathogenesis of psoriasis? *J Immunol.* 165:2240–50.

Rückert R., Brandt K., Braun A. et al. (2005). Blocking IL-15 prevents the induction of allergenspecific T cells and allergic inflammation in vivo. *J Immunol.* 174:5507–15.

Rückert R., Brandt K., Ernst M., Marienfeld K., Csernok E., Metzler C., et al. (2009). Interleukin-15 stimulates macrophages to activate CD4<sup>+</sup> T cells: a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Immunology.* 126 (1):63–73.

Rückert R., Herz U., Paus R., et al. (1998). IL-15-IgG2b fusion protein accelerates and enhances a Th2 but not a Th1 immune response in vivo, while IL- 2-IgG2b fusion protein inhibits both. *Eur J Immunol.* 28:3312-3320.

Saeed S., Revell P.A. (2001). Production and distribution of interleukin 15 and its receptors (IL-15Ralpha and IL-R2beta) in the implant interface tissues obtained during revision of failed total joint replacement. *Int J Exp Pathol.* 82:201–209.

Sandau M.M., Schluns K.S., Lefrançois L., Jameson S.C. (2004). Cutting edge: transpresentation of IL-15 by bone marrow-derived cells necessitates expression of IL-15 and IL-15Ra by the same cells. *J Immunol.* 173:6537–41.

Santos S. L. dos, Freitas L. M., Lobo F. P., Rodrigues-Luiz G. F., de Oliveira Mendes T. A., Oliveira A. C. S., et al. (2012). The MASP family of *Trypanosoma cruzi*: changes in gene expression and antigenic profile during the acute phase of experimental infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1779.

Santos-Lima, E. C. & Minoprio, P. (1996). Chagas' disease is attenuated in mice lacking gamma delta T cells. *Infection & Immunity* 64:215-221.

Satoh J., Kurohara K., Yukitake M, Kuroda Y. (1998). Interleukin-15, a T-cell growth factor, is expressed in human neural cell lines and tissues. **J Neurol Sci.** 155:170–7.

Schenkman, S. *et al.* (1994). Structural and functional properties of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Annu Rev Microbiol.** v. 48, p. 499-523.

Schettino P.M., Majumder S., Kierszenbaum F. (1995). Regulatory effect of the level of free Ca<sup>2+</sup> of the host cell on the capacity of *Trypanosoma cruzi* to invade and multiply intracellularly. **The Journal of Parasitology.** 81:597–602.

Schluns K.S., Klonowski K.D., Lefrançois L. (2004). Transregulation of memory CD8 T-cell proliferation by IL-15Ra+ bone marrow-derived cells. **Blood.** 103:988–94.

Schmunis GA (2007). Epidemiology of CD in non endemic countries: the role of international migration. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 102 (Suppl 1): 75–85.

Scott, P.; Trinchieri, G. (1995). The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Current Opinion in Immunology*, v. 7, p. 34.

Semple J. I., Sanderson C. M., Campbell R. D. (2002). “The jury is out on “guilt by association” trials,” **Brief Funct Genomic Proteomic.** vol. 1, no. 1, pp. 40–52.

Senigl F., Miklík D., Auxt M, Hejnar J. (2017) Accumulation of long-term transcriptionally active integrated retroviral vectors in active promoters and enhancers. **Nucleic Acids Res.** 2017 Dec 15; 45(22): 12752–12765.

Shinozaki M., Hirahashi J., Lebedeva T., Liew F.Y., Salant D.J., Maron R., et al., (2002). IL-15, a survival factor for kidney epithelial cells, counteracts apoptosis and inflammation during nephritis. **J Clin Invest.** 109: 951–60.

Singh A., Minia I., Droll D., Fadda A., Clayton C., Erben E. (2014) Trypanosome MKT1 and the RNA-binding protein ZC3H11: interactions and potential roles in post-transcriptional regulatory networks. **Nucleic Acids Res.** 42: 4652–68.

Sibley, L. D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. (2011) **Immunol Rev.** v. 240, p. 72-91.

Souza, W., Carvalho, T. M. U., and Barria, E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *Int. J Cell Biol.* 7: 388.

Stuart K., Brun R., Croft S., Fairlamb A., Gürtler R.E., McKerrow J., Reed S., Tarleton R.J (2008) Kinetoplastids: related protozoan pathogens, diferente diseases. **Clin Invest.** 118:1301-1310.

Stynen B., Van Dijck P., Tournu H. (2010). A CUG codon adapted two-hybrid system for the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Nucl. Acids Res.* 38:e184.

Tagaya Y., Burton J.D., Miyamoto Y., Waldmann T.A. (1996). Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells. **EMBO J.** 15:4928-4939.

Tagaya Y., Kurys G., Thies T.A., et al. (1997). Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. **Proc Natl Acad Sci, USA.** 94:14444-14449.

Taliaferro W.H., Tulo P. (1955). Connective Tissue Reactions in Normal and Immunized Mice to a Reticulotropic Strain of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Infectious Diseases.** 96:199–226.

Tan X.A., Wang D.B., Lu X.A., Wei H., Zhu R., Zhu S.S. et al. (2010). Doxorubicin induces apoptosis in H9c2 cardiomyocytes: role of overexpressed eukaryotic translation initiation factor 5A. **Biol Pharm Bull.** 33: 1666–1672.

Tarleton, R. L. et al. (2007). The challenges of Chagas Disease \_\_ grim outlook or glimmer of hope. **PLoS Med.** 4(12):332.

Teixeira S.M.R., Kirchhoff L.V., Donelson J.E. (1995). Pos-transcriptional elements regulating expression of mRNA of the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.** 270(38): 22586-22594.

Teixeira S.M.R., Russell D.G., Kirchhoff L.V., Donelson J.E. (1994). A differentially expressed gene family encoding “amastin”, a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **J. Biol. Chem.** 269(32): 20509-20516.

Tejman-Yarden N., Zlotnik M., Lewis E., Etzion O., Chaimovitz C., Douvdevani A. (2005). Renal cells express a functional interleukin-15 receptor. ***Nephrol Dial Transplant***. 20:516–23.

Tran P., Ahmad R., Xu J., Ahmad A., Menezes J. (2003). Host's innate immune response to fungal and bacterial agents in vitro: up-regulation of interleukin-15 gene expression resulting in enhanced natural killer cell activity. ***Immunology***. 109:263–70.

Uetz P., Glot L., Cagney G. et al., (2000). “A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*.” ***Nature***. vol. 403, no. 6770, pp. 623–627.

Vámosi G., Bodnár A., Vereb G., Jenei A., Goldman C.K., Langowski J., al. (2004). IL-2 and IL-15 receptor  $\alpha$ -subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. ***Proc Natl Acad Sci, USA***. 101:11082–7.

Van Belle T., Grooten J. (2005). IL-15 and IL-15Ra in CD4+ T cell immunity. ***Arch Immunol Ther Exp***. 53:115–26.

Vasconcelos J.R., Hiyane M.I., Marinho C.R., Claser C., Machado A.M., Gazzinelli R.T., Bruña-Romero O., Alvarez J.M., Boscardin S.B., Rodrigues M.M. (2004). Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. ***Hum Gene Ther***. 15: 878-886.

Vespa G. N., Cunha F. Q., Silva J. S. (1994). Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. ***Infect. Immunol***. 62, 5177–5182.

Von Kreuter B. F. Santos-Buch C.A. (1989) Modulation of *Trypanosoma cruzi* adhesion to host muscle cell membranes by ligands of muscarinic cholinergic and beta adrenergic receptors. ***Mol Biochem Parasitol***. 19893641–50.

Waldmann T.A., Tagaya Y. (1999). The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. ***Annu Rev Immunol***. 17:19-49.

Waldmann T.A. (2006). The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. ***Nat Rev Immunol*** 6(8):595–601.

Wang Q., Somwar R., Bilan P.J., et al. (1999). Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. ***Mol Cell Biol.*** 19:4008–4018.

Wang X., Rickert M., Garcia K.C. (2005). Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma receptors. ***Science.*** 310(5751):1159–63.

Wang Z.H., Ma P., Chen J., Zhang J., Chen C.B., Chen GQ. (2011). A transferable heterogeneous two-hybrid system in *Escherichia coli* based on polyhydroxyalkanoates synthesis regulatory protein PhaR. ***Microbial cell factories.*** 10:21.

Watkins S., Borthwick G., Arthur H. (2011). The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses *in vitro*. ***In Vitro Cell Dev Biol Anim.*** 47:125–131.

Watson R.W.G., Rotstein O.D., Padolo J., Bitar R., Marshall J.C. (1998). The IL-1b-converting enzyme (caspase-1) inhibits apoptosis of inflammatory neutrophils through activation of IL-1b. ***J Immunol.*** 161:957–62.

Wei X., Orchardson M., Gracie J.A., Leung B.P., Gao B., Guan H., et al. (2001). The Sushi domain of soluble IL-15 receptor  $\alpha$  is essential for binding IL-15 and inhibiting inflammatory and allogenic responses *in vitro* and *in vivo*. ***J Immunol.*** 167:277–82.

WHO (2015). Chagas disease (American trypanosomiasis). **World Health Organization.** Disponível em: <http://www.who.int/chagas/en/>

Wu Y., Fakhry Y.E., Sereno D., Tamar S., Papadopoulou B. (2000). A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. ***Mol. And Biochem. Parasitology.*** 110: 345-357.

Xu X., Sun Q., Yu X., Zhao L. (2017). Rescue of nonlytic Newcastle Disease Virus (NDV) expressing IL-15 for cancer immunotherapy. ***Virus Res.*** 233:35-41.

Yang L., Thornton S., Grom A.A. (2002). Interleukin-15 inhibits sodium nitroprusside-induced apoptosis of synovial fibroblasts and vascular endothelial cells. ***Arthritis Rheum.*** 46:3010–4.

Yoshida N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **An Acad Bras Cienc.** 78:87–111.

Young C., Losikoff P., Chawla A., Glasser L., Forman E. (2007). Transfusion acquired *Trypanosoma cruzi* infection. **Transfusion.** 47: 540-544.

Young, K. (1998). “Yeast two-hybrid: so many interactions, (in) so little time.” **Biology of Reproduction**, Champaign. v. 58, n. 2, p. 302-311.

Zhu X., Suen K-L., Barbacid M., Bolen J.B., Fargnoli J. (1994). Interleukin- 2-induced tyrosine phosphorylation of Shc proteins correlates with factor-dependent T cell proliferation. **J Biol Chem.** 269: 5518–22.

*Zoonosis y vectores [Zoonosis and vectors]*. Instituto de Salud del Estado de México [accessed: 19 November 2017]. Available at: <http://salud.edomexico.gob.mx/html/article.php?sid=335>.