

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO DA CAPACIDADE PATOGÊNICA DE *Trypanosoma cruzi*
ISOLADO EM AREQUIPA - ÁREA ENDÊMICA DO PERU**

Edward Valencia Ayala

Belo Horizonte – 2017

Edward Valencia Ayala

**CARACTERIZAÇÃO DA CAPACIDADE PATOGÊNICA DE *Trypanosoma cruzi*
ISOLADO EM AREQUIPA - ÁREA ENDÊMICA DO PERU**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Orientadora: Dr^a. Daniella Castanheira Bartholomeu

Co-orientadora: Dr^a. Denise da Silveira Lemos

Belo Horizonte – 2017

COLABORAÇÕES

Este trabalho é fruto da colaboração entre os Laboratórios de Genômica de Parasitos (LGP - Prof^ª. Dr^ª. Daniella Castanheira Bartholomeu e Prof^ª. Dr^ª. Denise da Silveira Lemos), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e do Laboratório de Investigação em Doenças Infecciosas (LIEI – Prof. Dr. Bob Gilman, Dr^ª. Maritza Calderon, Dr^ª. Manuela Verastegui e Dr. Holger Malpartida), da Faculdade de Ciências e Filosofia da Universidade Peruana Cayetano Heredia. Este trabalho conta ainda com a colaboração do Prof. Dr. Alexandre Ferreira Marques coordenador do Laboratório de Imuno-proteoma e Biologia de Parasitos (ICB – UFMG).

AGRADECIMENTOS

À Coordenadoria de Pós-graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, representado pelo Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara, pela possibilidade de integrar o curso e por todo o apoio oferecido;

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Daniella Castanheira Bartholomeu e co-orientadora Prof^a. Dr^a. Denise da Silveira Lemos, pela oportunidade de trabalho, orientação e principalmente pelo apoio dispensado sempre que precisei;

Ao Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas da Universidade Peruana Cayetano Heredia, representado pelos coordenadores Dr^a. Maritza Calderon Sanchez, Dr^a. Manuela Verastegui Pimentel e Dr. Holger Malpartida; pelo auxílio financeiro e estrutura para a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Alexandre Ferreira Marques, coordenador do Laboratório de Imuno-proteoma e Biologia de Parasitos, pela amizade, orientação sincera e energia contagiante e pela oportunidade de trabalhar juntos, estarei sempre agradecido;

A minha mãe Juana Ayala, a meu pai Saturnino Valencia, por serem modelos de coragem, pela paciência e total ajuda na superação dos obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo e a meus irmãos Nikita Valencia, John Valencia e Engels Valencia, pelo seu amor, incentivo e amizade, estarão em meu coração eternamente;

A meu amigo João Reis Cunha, pela amizade e apoio incondicional durante o desenvolvimento dos testes bioinformáticos;

A meus amigos Ramon, Maira, Gisele e Daniella do Laboratório de Imuno-proteoma e Biologia de Parasitos, a minhas amigas Angela, Edith, Nancy, Leny do Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas e a meus amigos Raul e Eleonora da Universidade Nacional Maior de “San Marcos”, pela colaboração oportuna e apoio constante;

À todos os professores cujos ensinamentos foram essenciais em minha formação;

À todos aqueles, que mesmo não mencionados, estiveram ao meu lado, contribuindo para a minha formação e para a realização deste estudo, o meu mais sincero e carinhoso muito obrigado....

DEDICATORIA

Dedico este trabalho em especial, a minha esposa Ruth Miriam Torres Silva e a meu amado filho Leonardo Valencia Torres. Agradeço infinitamente a vocês meus anjos pelo amor incondicional e pelo sacrifício que significou ficar longe de vocês.

“Nossos sacrifícios refletem a grandeza de nossos corações, os homens que fogem do sacrifício não conhecem nem vitória, nem derrota”. (*Evayal*)

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMO..... | 1 |
| 1 INTRODUÇÃO | 2 |
| 1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas: Epidemiologia, ciclo biológico e variabilidade genética de <i>T. cruzi</i> | 3 |
| 1.2 Estresse nitro-oxidativo de macrófagos infectados por <i>T. cruzi</i> | 9 |
| 1.2.1 Componentes da defesa antioxidante de <i>T. cruzi</i> | 13 |
| 1.3 Manifestações clínicas da doença de Chagas..... | 15 |
| 1.4 Resposta imune na doença de Chagas | 18 |
| 1.5 Infecção experimental do modelo camundongo..... | 20 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 22 |
| 3 OBJETIVOS | 24 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 25 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 25 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 26 |
| 4.1 Desenho representativo da metodologia | 27 |
| 4.2 Obtenção e cultivo das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 30 |
| 4.3 Extração do DNA das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 31 |
| 4.4 Genotipagem das cepas Arequipa, Colombiana, clone CL Brener e de diferentes isolados de <i>T. cruzi</i> | 31 |
| 4.5 Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c..... | 33 |
| 4.6 Avaliação da fagocitose das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c..... | 34 |
| 4.7 Avaliação imunofenotípica de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c após infecção com as cepas Arequipa, Colombiana e o clone CL Brener de <i>T. cruzi</i>..... | 36 |
| 4.8 Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de óxido nítrico (NO) de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c após infecção com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 37 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 4.9 | Avaliação do percentual de macrófagos infectados, índice de internalização, taxas de infecção e taxas de multiplicação dos parasitos. | 38 |
| 4.10 | Mapeamento de <i>reads</i> e montagem dos genes que codificam enzimas antioxidantes das cepas Arequipa e Colombiana de <i>T. cruzi</i>..... | 39 |
| 4.11 | Desenho de <i>primers</i> para cada um dos genes antioxidantes de <i>T. cruzi</i> | 40 |
| 4.12 | Avaliação <i>in silico</i> do número de cópias dos genes antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 40 |
| 4.13 | Avaliação <i>in vitro</i> do número de cópias dos genes antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 41 |
| 4.13.1 | Clonagem dos genes antioxidantes de <i>T. cruzi</i> | 41 |
| 4.13.2 | Ligação dos amplicons ao <i>pGEM-T easy</i> | 42 |
| 4.13.3 | Transformação de bactérias por eletroporação..... | 42 |
| 4.13.4 | Obtenção dos padrões para a quantificação <i>in vitro</i> dos genes antioxidantes de <i>T. cruzi</i> | 43 |
| 4.14 | Estimativa dos níveis de expressão das enzimas antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 44 |
| 4.14.1 | Extração de RNA total de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 44 |
| 4.14.2 | Avaliação dos níveis de expressão das enzimas antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 45 |
| 4.15 | Infecção experimental do modelo camundongo C57BL/6 com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 45 |
| 4.15.1 | Inóculo de tripomastigotas sanguíneos utilizados para infecção dos camundongos C57BL/6..... | 46 |
| 4.15.2 | Grupos experimentais de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 46 |
| 4.15.3 | Avaliação da parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 47 |
| 4.15.4 | Eutanásia dos grupos experimentais de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> .. | 47 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 4.15.5 | Extração de DNA do coração, colón e músculo esquelético de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener <i>T. cruzi</i> | 48 |
| 4.15.6 | Avaliação da carga parasitária tecidual do coração, colón e músculo esquelético de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener <i>T. cruzi</i> | 48 |
| 4.15.7 | Extração do RNA de tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener <i>T. cruzi</i> para avaliação da resposta imune celular | 49 |
| 4.15.8 | Avaliação da expressão de citocinas no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener <i>T. cruzi</i> | 50 |
| 4.16 | Análise estatística..... | 51 |
| 5 | RESULTADOS..... | 52 |
| 5.1 | TÓPICO I:..... | 54 |
| 5.1.1 | Análise genotípica da cepa Arequipa e diferentes isolados de <i>T. cruzi</i> | 54 |
| 5.1.2 | Caracterização da capacidade infectante das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 56 |
| 5.1.3 | Caracterização do perfil de ativação de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> pela presença de moléculas de superfície (MHC-II e CD80) e através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO)..... | 66 |
| 5.1.4 | Análise bioinformática das sequencias gênicas das enzimas antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 75 |
| 5.1.5 | Análise molecular das sequências gênicas das enzimas antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 80 |
| 5.2 | Tópico II | 95 |
| 5.2.1 | Determinação dos níveis de expressão das enzimas antioxidantes da cepa Arequipa-RE de <i>T. cruzi</i> | 95 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5.2.2 | Avaliação da parasitemia e sobrevivência de camundongos C57BL6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 98 |
| 5.2.3 | Determinação da carga parasitária em tecido cardíaco, colón e músculo esquelético de camundongos C57BL6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 100 |
| 5.2.4 | Determinação dos níveis de expressão de citocinas no tecido cardíaco de camundongos C57BL6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 104 |
| 6 | DISCUSSÃO | 110 |
| 7 | CONCLUSÃO | 128 |
| 8 | PERSPECTIVAS | 130 |
| 9 | BIBLIOGRAFIA | 132 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Casos da doença de Chagas no Peru..... | 5 |
| Figura 2: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 7 |
| Figura 3: Metabolismo oxidativo de macrófagos infectados com <i>T. cruzi</i> | 12 |
| Figura 4: Citotoxicidade de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio contra <i>T. cruzi</i> | 15 |
| Figura 5: Fases clínicas da Doença de Chagas..... | 17 |
| Figura 6: Protocolo para a genotipagem do <i>T. cruzi</i> | 32 |
| Figura 7: Marcação de tripomastigotas das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> com CFSE..... | 35 |
| Figura 8: Amplificação do gene citocromo oxidase II (COII)..... | 54 |
| Figura 9: Digestão enzimática com Alu I do gene COII..... | 55 |
| Figura 10: Amplificação do gene do espaçador intergênico do minixon (SL-IR)..... | 55 |
| Figura 11: Amplificação do gene rDNA 24S α (LSUrDNA)..... | 56 |
| Figura 12: Imagens representativas da infecção de macrófagos..... | 57 |
| Figura 13: Caracterização imunofenotípica de células coletadas do peritônio..... | 58 |
| Figura 14: Avaliação do percentual de fagocitose..... | 60 |
| Figura 15: Avaliação da capacidade infectante das cepas Arequipa, Colombiana e do clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 62 |
| Figura 16: Correlação entre o índice de internalização (Ii) e o percentual de macrófagos infectados (PMI)..... | 63 |
| Figura 17: Avaliação da capacidade infectante e replicativa das cepas Arequipa, Colombiana e do clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 65 |
| Figura 18: Avaliação da molécula do complexo maior de histocompatibilidade II (MHC-II)..... | 67 |
| Figura 19: Percentual do complexo maior de histocompatibilidade-II (MHC-II)..... | 68 |
| Figura 20: Avaliação da molécula apresentadora de antígenos CD80..... | 69 |
| Figura 21: Percentual de ativação da molécula apresentadora de antígenos CD80..... | 70 |
| Figura 22: Imagem representativa da produção intracelular de óxido nítrico (NO) e espécies reativas do oxigênio (EROs)..... | 71 |
| Figura 23: Produção intracelular de NO e EROs em macrófagos infectados com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> ou na presença de zimosan A..... | 73 |
| Figura 24: Correlação entre a produção de EROs e NO versus o processo de fagocitose..... | 74 |

| | |
|---|-----|
| Figura 25: Montagem das <i>reads</i> dos genes antioxidantes de <i>T. cruzi</i> no genoma de referência. | 75 |
| Figura 26: Alinhamento dos <i>contigs</i> dos genes antioxidantes das cepas Arequipa e Colombiana de <i>T. cruzi</i> | 76 |
| Figura 27: Alinhamento dos <i>contigs</i> dos genes antioxidantes das cepas Arequipa e Colombiana de <i>T. cruzi</i> | 77 |
| Figura 28: Avaliação do número de cópias <i>in silico</i> dos genes antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e do clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 79 |
| Figura 29: Número de cópias preditas <i>in silico</i> dos genes antioxidantes nas cepas Arequipa, Colombiana e no clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 79 |
| Figura 30: Amplificação das sequências dos genes antioxidantes de <i>T. cruzi</i> | 81 |
| Figura 31: Clonagem das sequências dos genes antioxidantes de <i>T. cruzi</i> no vetor <i>pGEM-T easy</i> | 82 |
| Figura 32: Purificação e normalização do DNA plasmidial contendo as sequências gênicas antioxidantes de <i>T. cruzi</i> | 82 |
| Figura 33: Eficiência da amplificação, linearidade e slope para o desenho da curva padrão ... | 83 |
| Figura 34: Eficiência da amplificação, linearidade e slope para o desenho da curva padrão.. | 84 |
| Figura 35: Avaliação do número de cópias de genes antioxidantes <i>in vitro</i> , nas cepas Arequipa, Colombiana e no clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 87 |
| Figura 36: Avaliação dos níveis de expressão de genes antioxidantes 24 horas após a infecção inicial, por <i>qPCR Real Time - Sybr Green</i> | 89 |
| Figura 37: Expressão dos genes antioxidantes nas cepas Arequipa, Colombiana e no clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 92 |
| Figura 38: Análise por Heatmap da expressão dos genes antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e do clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 94 |
| Figura 39: Expressão dos genes antioxidantes nas cepas Arequipa e Arequipa-RE de <i>T. cruzi</i> . | 97 |
| Figura 40: Análise da curva de parasitemia e percentual de sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> . | 99 |
| Figura 41: Avaliação da curva padrão para determinar a carga parasitária das cepas Arequipa, Colombiana e do clone CL Brener, por <i>qPCR Real Time - Taqman</i> | 100 |

- Figura 42:** Quantificação da carga parasitária em coração, colón e músculo esquelético de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* 103
- Figura 43:** Avaliação dos níveis de expressão de INF- γ no dia 15 pós-infecção inicial, por *qPCR Real Time - Sybr Green*..... 105
- Figura 44:** Expressão das citocinas no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*..... 107
- Figura 45:** Análise esquemática da expressão de citocinas no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* 109

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Isolados de <i>T. cruzi</i> provenientes de diferentes regiões geográficas..... | 32 |
| Tabela 2: <i>Primers</i> e programas de amplificação dos marcadores utilizados na genotipagem dos parasitos..... | 33 |
| Tabela 3: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos..... | 36 |
| Tabela 4: <i>Primers</i> para as análises da expressão gênica de citocinas no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com <i>T. cruzi</i> | 51 |
| Tabela 5: <i>Primers</i> desenhados com o programa <i>Eprimer3</i> , para as análises de estimativa de número de cópias e de expressão gênica das enzimas antioxidantes de <i>T. cruzi</i> | 77 |
| Tabela 6: Média do ciclo de <i>threshold</i> (Ct) da curva padrão de cada um dos genes antioxidantes e do controle endógeno de <i>T. cruzi</i> | 85 |
| Tabela 7: Número de cópias dos genes antioxidantes das cepas de <i>T. cruzi</i> | 86 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1: Desenho esquemático das metodologias referentes aos objetivos um e quatro deste trabalho..... | 27 |
| Quadro 2: Desenho esquemático das metodologias referentes aos objetivos dois, 3 e cinco deste trabalho..... | 28 |
| Quadro 3: Desenho esquemático das metodologias referentes aos objetivos seis e sete deste trabalho..... | 29 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|--|--|
| AG: Aminoguanidina | GPX: Glutaciona peroxidase dependente de cisteína |
| AMP: Ampicilina | H ₂ O ₂ : Peróxido de hidrogênio |
| APX: Ascorbato peroxidase | HEPES: Acido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonico |
| ATP: Adenosina trifosfato | IFN- γ : Interferon-gama |
| BSA: Albumina bovina sérica | Ig: Imunoglobulina |
| Carboxy-H2DCFDA: (5-ou-6)-carboxy-2',7' dichlorodihydro fluoresceina diacetato | IL: Interleucina |
| cDNA: DNA complementar | iNOS: Oxido nítrico sintase induzida |
| CFSE: Éster de succinimidil-carboxifluoresceína | IP: Iodeto de Propídio |
| COII: Gene da citocromo oxidase subunidade 2 | Kb: Kilobases |
| CPX: Triparedoxina peroxidase citosólica | kDNA: DNA do quinetoplasto |
| CT: Ciclo de <i>threshold</i> | LIT: Infusão fígado triptose |
| DAF-2T: Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína desidrogenase | LPS: Lipopolissacarídeo |
| DMEM: Dulbecco Médio Essencial Mínimo | M: Molar |
| DNA: Ácido desoxirribonucleico | Mb: Megabases |
| dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados | mg: Miligrama |
| DPI: Diphenyleneiodonium chloride | ml: Mililitro |
| EDTA: Acido etilenodiamino tetra-acético | mM: Milimolar |
| Eq-p/mg: Equivalente parasito por miligrama | MPX: Triparedoxina peroxidase mitocondrial |
| EROs: Espécies reativas de oxigênio | mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro |
| FACS: <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> | NADPH oxidase: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase |
| FITC: Isotiocianato de fluoresceína | NFX: Nifurtimox |
| GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase | NK: Células <i>natural killer</i> |
| GM-CSF: Fator estimulador de colônia para granulócitos e macrófagos | NO: Óxido nítrico |
| | O ²⁻ : Ânion superóxido |
| | OH: Radical hidroxila |
| | ONOO ⁻ : Peroxinitrito |

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos

pb: Pares de bases

PBS: Salina tamponada com fosfato

PBS (P): Salina tamponada com fosfato - permeabilizante

PBS (W): Salina tamponada com fosfato de lavagem

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PE: Ficoeritrina

PGP: Fosfoglicoproteína de membrana

PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate

pmoles: Picomoles

PRR: Receptor de reconhecimento padrão

PSG: Tampão fosfato de sódio, cloreto de sódio e glicose

RANTES: *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*

Real time PCR: PCR em tempo real

RFLP: Técnica do Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição

Tm: Temperatura de *melting*

RESUMO

Trypanosoma cruzi é um parasito complexo e heterogêneo, formado por seis grupos filogenéticos, DTU TcI a TcVI, que possuem grande variação intraespecífica, podendo apresentar diferentes formas sanguíneas, patogenicidade, sensibilidade a drogas, perfil antigênico, dentre outras características. Neste trabalho foi avaliada a capacidade infectante ou invasiva e a defesa antioxidante de um isolado de “La Joya”, região situada ao Oeste da cidade de Arequipa, Peru, identificado neste trabalho como pertencente a DTU TcI. Nossos experimentos foram realizados em uma perspectiva comparativa com a cepa Colombiana (DTU TcI), reportada por alguns grupos como sendo virulenta, e com o clone CL Brener (DTU TcVI), também considerado um clone virulento do parasito. As análises da capacidade proliferativa *in vitro* no interior de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c mostraram que a cepa Arequipa foi a menos infectiva, apresentando menores taxas de infecção e multiplicação, quando comparada com Colombiana e CL Brener. As respostas efetoras dos macrófagos foram analisadas e os resultados mostraram que a cepa Arequipa induz maiores percentuais das moléculas oxidantes EROs e NO, quando comparada com Colombiana e CL Brener. A avaliação da expressão das enzimas antioxidantes do parasito TcAPX, TcCPX, TcMPX, TcTrS, TcTrR, TcSodA e TcSodB na infecção *in vitro* de macrófagos, mostrou menores níveis destas enzimas, na cepa Arequipa nos tempos iniciais da infecção quando comparada às outras duas cepas. Após insucesso na infecção experimental em camundongos C57BL/6, a cepa Arequipa foi reativada (Arequipa-RE) através de passagens no triatomíneo resultando no aumento na expressão das enzimas TcTrS, TcAPX, TcMPX e TcCPX, nas primeiras horas após infecção *in vitro* de macrófagos, quando comparado com a Arequipa não infectante. Avaliamos também a infecção *in vivo* de camundongos C57BL/6 naturalmente resistentes ao *T. cruzi*. Os resultados mostraram que a cepa Arequipa-RE apresentou níveis de parasitemia e parasitismo tecidual semelhante à cepa Colombiana, com tropismo preferencialmente cardíaco e no cólon, embora Arequipa-RE tenha uma menor carga parasitária tecidual quando comparado com a cepa Colombiana. A cepa CL Brener apresentou maiores níveis de parasitemia, mortalidade, e parasitismo tecidual em relação às outras duas cepas, e tropismo cardíaco e de músculo esquelético. A avaliação da expressão de citocinas pró-inflamatórias INF- γ , TNF- α e IL-12 e anti-inflamatória IL-10 no tecido cardíaco de animais infectados, mostrou indução precoce na síntese de todas as citocinas avaliadas na infecção com a cepa Arequipa-RE, em comparação com Colombiana e clone CL Brener. Nossos resultados indicam, portanto, baixa capacidade infectante *in vitro* e *in vivo* da cepa Arequipa, com um rápido controle imunológico da replicação parasitária e modulação da resposta imune.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is a complex and heterogeneous parasite, formed by six phylogenetic groups, DTU TcI to TcVI, which have great intraspecific variation, presenting different blood forms, pathogenicity, drug sensitivity, and antigenic profile, among other characteristics. In this work, we evaluated the infective or invasive capacity and antioxidant defense of a "La Joya" isolate, a region located in the west of the city of Arequipa, Peru, identified in the present work as DTU TcI. Our *in vitro* and *in vivo* experiments were carried out in a comparative perspective with Colombiana strain (DTU TcI), a virulent strain, and with CL Brener (DTU TcVI) also considered as a virulent clone of the parasite. The analysis of the proliferative capacity of each strain in *in vitro* infections of peritoneal macrophages obtained from BALB/c mice showed that Arequipa strain was the least infective, presenting lower rates of infection and multiplication when compared to Colombiana and CL Brener. Macrophage effector responses were analyzed and the results showed that Arequipa strain induces higher percentages of the oxidant molecules EROs and NO when compared to Colombiana and CL Brener. The evaluation of the expression of the parasite antioxidant enzymes TcAPX, TcCPX, TcMPX, TcTrS, TcTrR, TcSodA and TcSodB in *in vitro* infection of macrophages showed lower levels of TcMPX, TcTrR, TcSrA, TcSodA and TcSodB by Arequipa in the initial time points when compared to the other two strains. After several attempts, infection of C57BL/6 mice with Arequipa strain was unsuccessful. This strain was then reactivated (Arequipa-RE) through triatomine passages resulting in increased expression of TcTrS, TcAPX, TcMPX and TcCPX enzymes in the first hours after *in vitro* macrophages infection, compared to the non-infective Arequipa. We also evaluated the experimental infections of C57BL/6 mice with each strain. The results showed that Arequipa-RE strain presented similar levels of parasitemia and tecidual parasitism as Colombiana strain, with a predominant tropism to heart and colon, although Arequipa-RE had a lower tissue parasitism compared to the Colombiana strain. CL Brener clone presented higher levels of parasitemia, mortality, and tissue parasitism in relation to the other two strains, and cardiac and skeletal muscle tropism. The evaluation of the proinflammatory cytokines INF- γ , TNF- α and IL-12 and anti-inflammatory IL-10 in the cardiac tissue of infected mice showed early induction in the synthesis of all the cytokines evaluated in the strain Arequipa infection, when compared with Colombiana and CL Brener. Our results therefore indicate low *in vitro* and *in vivo* infectivity of the Arequipa strain, with rapid immunological control of parasite replication and modulation of the immune response.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas: epidemiologia, ciclo biológico e variabilidade genética de *T. cruzi*

A doença de Chagas foi descoberta em 1909 pelo médico Carlos Chagas, quando fazia parte da campanha antimalárica na cidade de Lassance (Minas Gerais). Inicialmente os parasitos flagelados encontrados no intestino de insetos, com hábitos hematófagos, foram denominados por Carlos Chagas como *Schyzotrypanum cruzi* e subsequentemente como *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (Brener, 1989). Nesse mesmo ano, Carlos Chagas descreveu as características biológicas do hospedeiro vertebrado e invertebrado, o agente etiológico, seus reservatórios e identificou o barbeiro como o inseto transmissor, assim também, descreveu aspectos relacionados à patogenia e sintomatologia da doença produzida por este parasito. A tríplice descoberta do agente etiológico, vetor e manifestações clínicas da doença, fazem da descoberta de Carlos Chagas um fato único na história da medicina (Brener, 1989). Apesar da descoberta relativamente recente, esta doença ocorre há muito tempo, evidenciado pela presença do DNA do parasito em tecidos mumificados do Peru e Chile que tem uma data de cerca de 9000 anos (Forniciari *et al.*, 1992; Aufderheide *et al.*, 2004). No Peru, os primeiros registros da doença de Chagas datam de 1917 na cidade de Arequipa, onde foi encontrado o vetor *Triatoma infestans*, conhecido nesta área endêmica como “chirimacha” (Monge, 1914; Escomel, 1917) e também de 1919 na cidade de Madre de Dios, onde foi diagnosticado o primeiro caso da doença de Chagas neste país.

T. cruzi é classificado como um protozoário flagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Este parasito unicelular apresenta um único flagelo e um cinetoplasto que contém o DNA mitocondrial (Telleria *et al.*, 2006), sendo transmitido por insetos hematófagos (barbeiros) os quais pertencem à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Essa família tem vários transmissores de *T. cruzi*, sendo as principais espécies nas Américas o *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (Gaunt e Miles, 2000; Rassi *et al.*, 2000). O ciclo de vida de *T. cruzi* é heteroxênico (Fig. 1), apresentando hospedeiros invertebrados (triatomíneos) e uma grande variedade de hospedeiros vertebrados (mamíferos). *T. cruzi* apresenta três formas morfológicas evolutivas, no triatomíneo se encontram as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas e nos hospedeiros vertebrados, as formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas sanguíneas.

A infecção pelo *T. cruzi* inicia-se quando o triatomíneo infectado se alimenta do sangue do hospedeiro vertebrado e ao mesmo tempo libera aos tripomastigotas metacíclicos infectantes, nas fezes ou urina, sobre a pele lesionada ou diretamente sobre a mucosa (Brenner *et al.*, 2000). A infecção também pode ocorrer por transfusão sanguínea, através da via congênita, por acidentes de laboratório e por transplantes de órgãos. Além disso, recentemente foram registrados casos de infecção via oral, através da ingestão de alimentos contaminados com os triatomíneos infectados ou seus dejetos (Dias, 1989; Bittencourt, 2000). No interior do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos podem invadir qualquer célula nucleada e transformar-se em amastigotas ao atingirem o citoplasma da célula parasitada (Andrews, 1990; Dvorak e Hyde, 1973), onde se inicia uma série de divisões binárias. Posteriormente, os amastigotas se transformam novamente em tripomastigotas que rompem mecanicamente a membrana plasmática da célula hospedeira e são liberadas no meio extracelular (Low *et al.*, 1992; De Souza, 2002), podendo atingir a corrente sanguínea ou infectar células vizinhas (Storino e Milei, 1994).

O ciclo continua quando estes tripomastigotas são ingeridos por triatomíneos em um novo repasto sanguíneo (Ley *et al.* 1988). Os tripomastigotas sanguíneos se transformam em epimastigotas no intestino médio do triatomíneo, e em seguida, sofrem divisão binária longitudinal e podem ligar-se às células epiteliais do intestino médio e posterior (Billingsley e Downe, 1986). Posteriormente, os epimastigotas migram na luz do intestino atingindo o reto, onde se transformam em tripomastigotas metacíclicas infectantes (Gonzalez *et al.*, 1999), que podem ser eliminados nas fezes ou urina durante o novo repasto sanguíneo.

T. cruzi sofre diferenciação duas vezes no intestino do triatomíneo, sendo a primeira de tripomastigotas sanguíneos em epimastigotas e a segunda de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos (Garcia e Azambuja, 1991; Zelendon 1974). Alterações biológicas acentuadas acompanham a transformação de epimastigota em tripomastigota metacíclico, incluindo a capacidade do tripomastigota de sobreviver em hospedeiros vertebrados, em contraste com o epimastigota que é destruído pelo sistema do complemento (Nogueira *et al.* 1976). Por outro lado, é sabido que a virulência de *T. cruzi* pode mudar durante a manutenção do parasito em cultura *in vitro* (Bice e Zeledon, 1970, Chiari, 1974). A passagem contínua em culturas *in vitro* de parasitos na forma de tripomastigotas ou epimastigotas pode causar a perda de sua infectividade tanto para hospedeiros vertebrados quanto para triatomíneos. Em contrapartida, a

passagem contínua em hospedeiros vertebrados (camundongos, ratos, hamsters ou cobaias) ou em triatomíneos, garante que as cepas de *T. cruzi* mantenham sua infectividade e virulência (Garcia e Azambuja, 1997). Uma técnica comum usada para infectar experimentalmente triatomíneos envolve a alimentação destes diretamente de animais vivos infectados, com alta parasitemia ou através da refeição artificial do sangue infectado usando um dispositivo de membrana (Garcia e Azambuja, 1997). A capacidade infectiva de diferentes cepas de *T. cruzi* depende em grande medida de sua interação com moléculas protetoras dos hospedeiros e da expressão de diversas moléculas de superfície do parasito, como as mucinas ancoradas com glicosilfosfatidilinositol (GPI) que estão envolvidas na proteção parasitária e estabelecimento de uma infecção persistente (Gonzalez *et al.*, 2013).

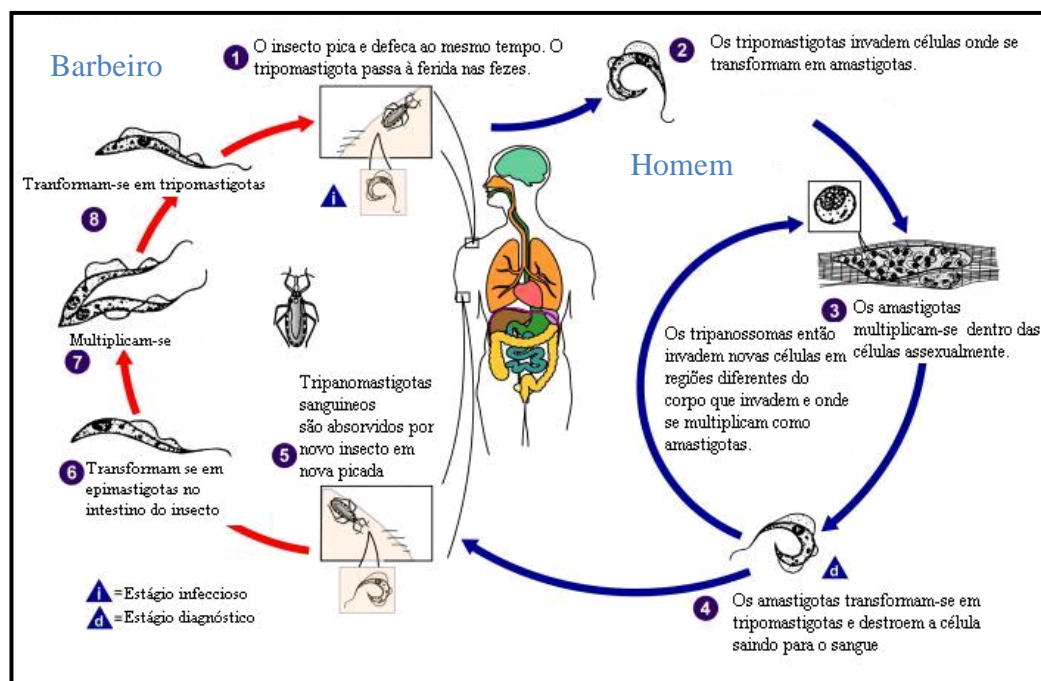


Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.
Retirado e modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

A doença de Chagas é uma zoonose típica das regiões tropical e subtropical da América Latina, estendendo-se até a região sul dos Estados Unidos da América (Dias, 2006a). Nos últimos anos, entretanto, com a migração da população rural para áreas urbanas, observou-se a dispersão de *T. cruzi* e seus vetores, situação conhecida como urbanização da doença de Chagas (Marconcini, 2008). No Peru, estima-se que 650,000 a 680,000 pessoas tenham infecção por *T.*

cruzi (WHO, 2002) com uma população em risco entre 5 e 6,5 milhões de habitantes (Cuba *et al.*, 2002). A região de maior prevalência da doença de Chagas neste país corresponde à cidade de Arequipa, de onde provém mais do 80% dos casos reportados pelo sistema de vigilância epidemiológica do Ministério da Saúde (MINSA) (Cabrera, 2008) (Fig. 2). Nesta região, encontra-se somente *Triatoma infestans* intradomiciliar como o vetor do parasito sendo notificado em 22 distritos. Nesta área, desde 2003, existem estratégias para erradicação da doença de Chagas, que consistem na fumigação contínua com inseticidas para a eliminação do vetor. Entretanto, esta iniciativa representa um desafio devido à resistência da população às campanhas de fumigação, assim como ao pouco interesse das autoridades governamentais (MINSA, 2005).

Nestas zonas endêmicas, os reservatórios mais importantes de *Trypanosoma cruzi* são os mamíferos pequenos, embora, todo mamífero pode ser potencialmente um bom reservatório. Os principais reservatórios são os roedores como o porquinho da índia ou cobaia (*Cavia porcellus*), animais sinantrópicos como camundongos (*Mus musculus*) e os ratos (*Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*) (Ayaqui *et al.*, 1988). No Peru, o porquinho da índia é considerado como o principal reservatório da doença de Chagas, e o seu transporte de uma localidade para outra promove o fácil traslado do parasito (Herrer, 1955).

No ano de 1965, o Ministério da Saúde do Peru com a coordenação do Dr. Melchor Flores realizou a primeira campanha de controle na região sul - ocidental do país (Flores *et al.*, 1978). O programa foi baseado na eliminação do vetor através do uso de inseticidas nas casas infestadas (principalmente com derivados piretróides), além de campanhas para impedir a transmissão por transfusão sanguínea. Estas medidas permitiram alcançar o sucesso no controle da doença de Chagas em cidades como Moquegua e Tacna, as quais foram consideradas, recentemente, livres de transmissão vetorial. No entanto, situação semelhante não foi alcançada na cidade de Arequipa, que atualmente continua sendo um problema de saúde pública, onde a transmissão do *T. cruzi* ainda é prevalente (Náquira, 2014; Delgado *et al.*, 2013).

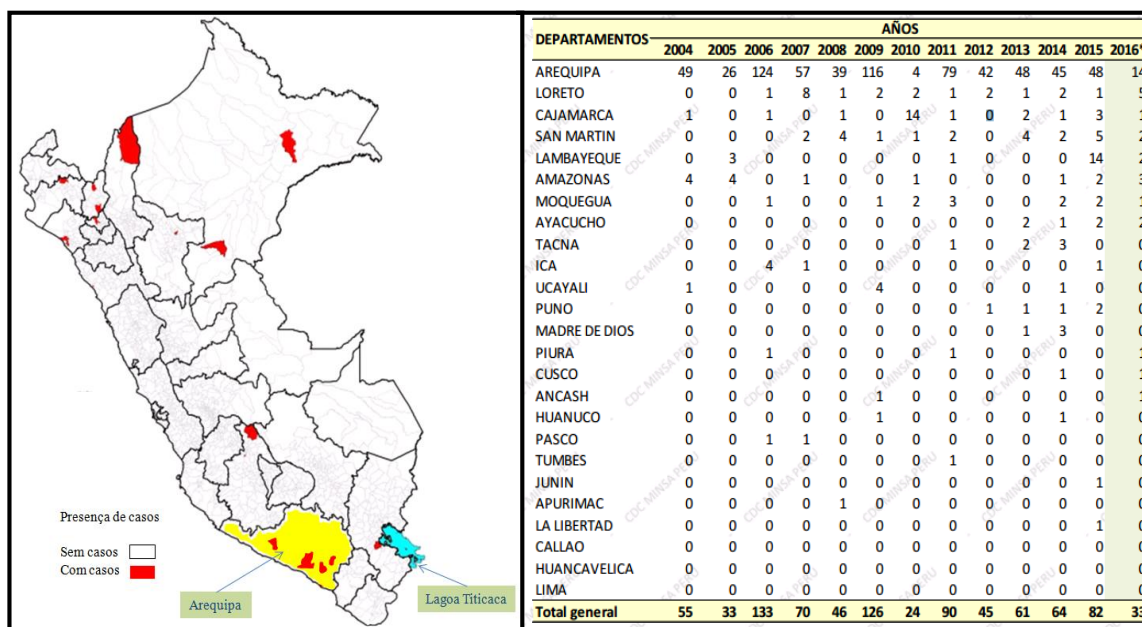


Figura 2: Casos da doença de Chagas no Peru de 2004 até a Quinquagésima segunda semana epidemiológica em 2016. Fonte: Rede Nacional de Epidemiologia (RENACE) - DGE-MINSA. Em amarelo, está destacado o departamento (região) de Arequipa, onde se encontra a cidade de Arequipa.

T. cruzi é um parasito muito complexo e heterogêneo, incluindo um amplo grupo de cepas com uma variação intraespecífica que vem sendo documentada pela caracterização biológica e genética, morfologia de formas sanguíneas, patogenicidade, sensibilidade a drogas, perfil antigênico, taxa de crescimento, metaciclogênese e tropismo por determinados tecidos (Murta e Romanha, 1999; Macedo *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2006). A variabilidade genética de *T. cruzi* foi demonstrada inicialmente por análises de isoenzimas (Zingales *et al.*, 1998; Miles *et al.*, 1977), que determinaram o polimorfismo do perfil eletroforético de seis enzimas e sugeriram uma classificação em três grupos distintos, os quais foram denominados zimodemas Z1, Z2 e Z3 (Miles *et al.*, 1977, 1978, 1980). Estes zimodemas foram associados às cepas que circulam no ciclo de transmissão silvestre (Z1 e Z3) e àquelas que circulam no ciclo doméstico (Z2) (Miles *et al.*, 1978, 1980; Barret *et al.*, 1980). Posteriormente, análises de kDNA-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism of Kinetoplast DNA*) demonstraram que as populações dos parasitos apresentam padrões idênticos ou similares de restrição no minicírculo do kDNA, denominados como *schizodemes* (Morel *et al.*, 1980), os quais tiveram correlação com a classificação pela análise de isoenzimas (Tibayrenc e Ayala, 1987).

Vários outros trabalhos também demonstraram a variação genética de *T. cruzi*, como as análises de RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (Steindel *et al.*, 1993) baseado

na amplificação do DNA genômico utilizando *primers* únicos, curtos e de sequência arbitrária, os quais geraram perfis de bandas complexos que permitiram estabelecer a relação genética entre diferentes isolados de *T. cruzi* (Welsh e McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Além disso, análises de LSSP-PCR (*Low Stringency Single Specific Primer*) (Vago *et al.*, 1996) foram utilizadas para a identificação de fragmentos de kDNA de *T. cruzi*, a partir de amostras de pacientes infectados o que permitiu a identificação e caracterização genética de *T. cruzi* sem a necessidade de isolamento do parasito. Estas técnicas mencionadas previamente demonstraram uma elevada diversidade genética de *T. cruzi*. No entanto, outras análises das sequências gênicas mostraram o dimorfismo das cepas do parasito. Neste sentido, a amplificação do gene do mini-éxon (região do espaçador não transcrito) e do gene 24Sα rDNA (região divergente na porção terminal 3') mostrou uma divisão das cepas de *T. cruzi* em duas linhagens: cepas da linhagem 1 produziam amplicons de 125pb e 300pb, e cepas da linhagem 2, produziam amplicons de 110pb e 350pb (Souto *et al.*, 1996).

Deste modo, visando resolver as diferenças na classificação genética de *T. cruzi*, foi realizado um Simpósio Internacional comemorativo ao 90º aniversário da descoberta da doença de Chagas, no Rio de Janeiro, Brasil, em Abril de 1999. Nesta reunião foi reconhecida a subdivisão de *T. cruzi* em duas linhagens ancestrais (*T. cruzi* I e *T. cruzi* II) (Anonymous, 1999). *T. cruzi* I (Tc I) inclui cepas com características como: Zimodema 1 (Z1), grupo miniexon 2 e haplótipo mitocondrial A. *T. cruzi* II (Tc II) inclui cepas com características como: Zimodema 2 (Z2), grupo miniexon 1 e haplótipo mitocondrial C (Momen, 1999; Machado e Ayala, 2001). Posteriormente, baseados em análises do gene citocromo oxidase II (COII), foi proposta a subdivisão da linhagem ancestral Tc II em cinco subgrupos: TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIIId e TcIIe (Brisse *et al.*, 2000a, b; 2001). No entanto, uma nova proposta passou a classificar cada subgrupo como um grupo independente ou DTU (*Discrete Typing Units*). Desta forma, o grupo TcI e o subgrupo TcIIb foram denominados DTU I e II, respectivamente, e os subgrupos TcIIa, TcIIc, TcIIId e TcIIe foram denominados DTU IV, III, V e VI, respectivamente (Zingales *et al.*, 2009). No Peru o DTU I é mais frequente na transmissão intradomiciliar, mas outras cepas de *T. cruzi* isoladas da zona oriental e norte foram caracterizadas como DTU II e IV (Jenny Ancca, comunicação pessoal; Vargas, 2005).

1.2 Estresse nitro-oxidativo de macrófagos infectados por *T. cruzi*

A capacidade infectante ou invasiva de *T. cruzi* pode variar conforme a cepa, a forma evolutiva do parasito, bem como os fatores próprios da célula-alvo. Este processo pode ser dividido em adesão e reconhecimento, sinalização e interiorização (Kreier *et al.*, 1977; Yoshida e Cortez, 2008). O *T. cruzi* tem a capacidade de invadir tanto células fagocíticas quanto não fagocíticas, incluindo macrófagos, fibroblastos, células musculares estriadas e lisas, células nervosas, adipócitos, dentre outras (Andrade e Andrews, 2005; Hall e Pereira, 2000). Da mesma forma, este parasito pode invadir e proliferar em qualquer linhagem celular de mamífero mantida em cultura *in vitro* (Araujo-Jorge, 1992; Burleigh e Andrews, 1995a).

Após a invasão celular, o ciclo intracelular de *T. cruzi* dura entre cinco a sete dias e começa com a formação do vacúolo parasitóforo (Rodriguez *et al.*, 1996). Aproximadamente 2 horas após a invasão, o ambiente ácido do vacúolo parasitóforo promove a síntese da proteína tipo porina (Tc-Tox), a qual produz a lise da membrana vacuolar. Finalmente os tripomastigotas são liberados no citoplasma, onde se diferenciam e multiplicam livremente como amastigotas (Andrews e Whitlow, 1989; Hall, 1993). Durante a invasão celular, moléculas na superfície do *T. cruzi* interagem com componentes da célula hospedeira; sendo que neste parasito as principais moléculas de adesão e invasão são a glicoproteína de 85 kD (gp85), a gp82, a gp35/50 e as transialidases (Ouassiss *et al.*, 1986; Alves *et al.*, 1986). No processo de invasão também estão envolvidas moléculas de membrana das células hospedeiras (proteínas de reconhecimento) como ácido siálico e o receptor TGF- β , assim como proteínas da lâmina basal como fibronectina e laminina (Giordano *et al.*, 1999; Campos *et al.*, 2001).

Durante a interação com células fagocíticas do sistema imune inato, o *T. cruzi* pode ser internalizado por um processo fagocítico clássico com formação de projeções na superfície celular (Nogueira e Cohn, 1976) ou através de um processo de entrada ativa (Kipnis *et al.*, 1979). Neste sentido, os macrófagos são as primeiras populações celulares a migrarem para o foco inflamatório e sua ativação contribui para o estabelecimento da resposta imune frente à infecção por *T. cruzi*. Os macrófagos podem ser ativados de forma clássica, através de citocinas como IFN- γ e TNF- α , ou por meio de indutores tais como os ligantes dos receptores tipo Toll (TLR). Diferentes ligantes de TLRs já foram identificados em *T. cruzi*, como as glicoproteínas tipo mucina ancoradas por GPI expressas na superfície de tripomastigotas, as quais induzem

uma resposta inflamatória através da ativação de TLR2 (Campos *et al.*, 2001), as ceramidas livres contendo glicoinositolfosfolipídeos que estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos via TLR4 (Oliveira *et al.*, 2004), enquanto TLR7 reconhece sequências de RNA do parasito (Caetano *et al.*, 2011) e seu DNA genômico ativa TLR9 (Bafica *et al.* 2006; Bartholomeu *et al.*, 2008).

Em definitiva, a ativação dos macrófagos induz a morte de parasitos intracelulares, devido principalmente à produção de radicais livres como o óxido nítrico (NO). Assim também, durante a atividade antiparasitária de macrófagos, o metabolismo do oxigênio molecular (O_2) pode ser reduzido parcialmente, aceitando um, dois ou três elétrons com a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs) como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila, respectivamente (Chance *et al.*, 1979; Droge, 2002; Turrens, 2003). Além disso, é importante mencionar que ocorre o aumento da expressão do complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC II) junto com as moléculas de superfície CD80 e CD86, as quais são importantes na apresentação antigênica para linfócitos Th1 (Goerdt e Orfanos, 1999; Katakura *et al.*, 2004; Mantovani *et al.*, 2004).

No entanto, *T. cruzi* pode controlar a resposta inflamatória mediada por macrófagos, através da indução da síntese de TGF- β (fator de crescimento tumoral - beta) (Freire de Lima *et al.*, 2000) que atua inibindo o metabolismo de L-arginina; importante para a síntese de óxido nítrico (NO) através da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Por outro lado, TGF- β pode induzir a síntese de poliaminas através da arginase e ornitina descarboxilase (ODC). A indução de arginase reduz a quantidade de L-arginina disponível, que é o substrato para o iNOS, reduzindo assim a quantidade de NO produzido. NO pode matar *T. cruzi*; contrariamente, as poliaminas podem favorecer o crescimento deste parasito, além de ser precursoras para a síntese de tripanotona, a qual protege o parasito contra as moléculas oxidativas (Pufahl *et al.*, 1992; Thomson *et al.*, 2003). Outra citocina importante na modulação da resposta de macrófagos é a interleucina 10 (IL-10), que atua inibindo a produção do interferon gama (IFN- γ) com uma consequente diminuição de NO o que finalmente aumenta a susceptibilidade à infecção por *T. cruzi* (Silva *et al.*, 1992; Reed *et al.*, 1994). Do mesmo modo, *T. cruzi* pode evadir-se do ambiente altamente nitro-oxidativo presente nos macrófagos, conseguindo sobreviver e estabelecer a infecção, utilizando defesas bioquímicas antioxidantes (peroxidases)

que atuam inibindo NO e EROs. (Piacenza *et al.*, 2009; Aliberti *et al.*, 1996; Thomson *et al.*, 1999).

Estudos realizados sobre os efeitos do NO, mostraram que altos níveis de NO têm ação antiparasitária *in vitro* e *in vivo*, sendo um dos principais mecanismos de defesa do hospedeiro (Gazzinelli *et al.*, 1992; Ameisen *et al.*, 1995). No entanto, outros experimentos *in vitro* de infecção de macrófagos por *T. cruzi*, mostraram que uma pequena quantidade nanomolar de NO pode favorecer a proliferação do parasito, possivelmente pela via de sinalização através do guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Peluffo *et al.*, 2004). Neste sentido, as funções efetoras ou moduladoras do NO, que podem matar ou favorecer o crescimento de *T. cruzi*, são vistos em paralelo durante a infecção de macrófagos não ativados (Silva *et al.*, 2003; Petray *et al.*, 1994). Da mesma forma, vários estudos mostraram que EROs podem afetar os processos biológicos de *T. cruzi* como causar lesão da membrana celular ou modificações do DNA (Lewis *et al.*, 1986). De maneira oposta, trabalhos recentes mostraram que EROs permitem a sobrevivência do parasito no interior de macrófagos peritoneais (Goes *et al.*, 2016), a hipótese é que devido ao estresse oxidativo, ocorre mobilização do ferro dos estoques intracelulares do hospedeiro, o qual é um componente essencial durante a divisão das formas amastigotas (Paiva *et al.*, 2012, 2014).

Estudos de comparação da infecção de macrófagos por diferentes cepas de *T. cruzi* mostraram que macrófagos infectados com a cepa Sylvio (Sylvio X10/4) de linhagem TcI produziram baixos níveis de NO e EROs, quando comparados com macrófagos infectados com cepas menos virulentas como TCC também da linhagem TcI. A infecção por estas últimas resultou em um aumento de até duas vezes nos níveis de NO, embora apresentaram níveis de EROs semelhantes aos macrófagos infectados com as cepas mais virulentas (Koo *et al.*, 2016).

A resposta efetora dos macrófagos inicia-se após a fagocitose de *T. cruzi*, com ativação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPHox), presente na membrana do macrófago, resultando na produção do metabolito O_2^- , o qual pode produzir H_2O_2 ou reagir com NO, que é transportado por difusão controlada, resultando na formação do peroxinitrito ($ONOO^-$) (Fig. 3), que é uma molécula efetora, fortemente oxidante e citotóxica para *T. cruzi*, que pode causar danos diretos via mecanismos de oxidação de moléculas como tióis de baixo peso molecular e centros metálicos (Alvarez *et al.*, 2010; Denicola *et al.*, 1993; Piacenza *et al.*, 2009). O NO isolado é difuso e não atua como um forte oxidante, sendo pouco provável que

represente dano direto aos parasitos, uma vez que seus efeitos dependem principalmente de sua reação com o O_2^- (Ferrer-Sueta e Radi, 2009). Além disso, pode ocorrer também a formação de EROs secundários que incluem radical hidroxil (OH), dióxido de nitrogênio (NO_2) e carbonato (CO_3^-) (Fig. 3), os quais podem oxidar lipídeos, DNA e participar na oxidação e nitração de proteínas, sendo então indicadores do estresse nitro-oxidativo (Calcerrada *et al.*, 2011; Naviliat *et al.*, 2005). Nesta situação, onde mediadores oxidantes derivados do hospedeiro são ativamente gerados, os níveis das defesas antioxidantes de *T. cruzi* tornam-se importantes para a sobrevivência e persistência do parasito no início da infecção (Peluffo *et al.*, 2004; Piacenza *et al.*, 2008, 2009).

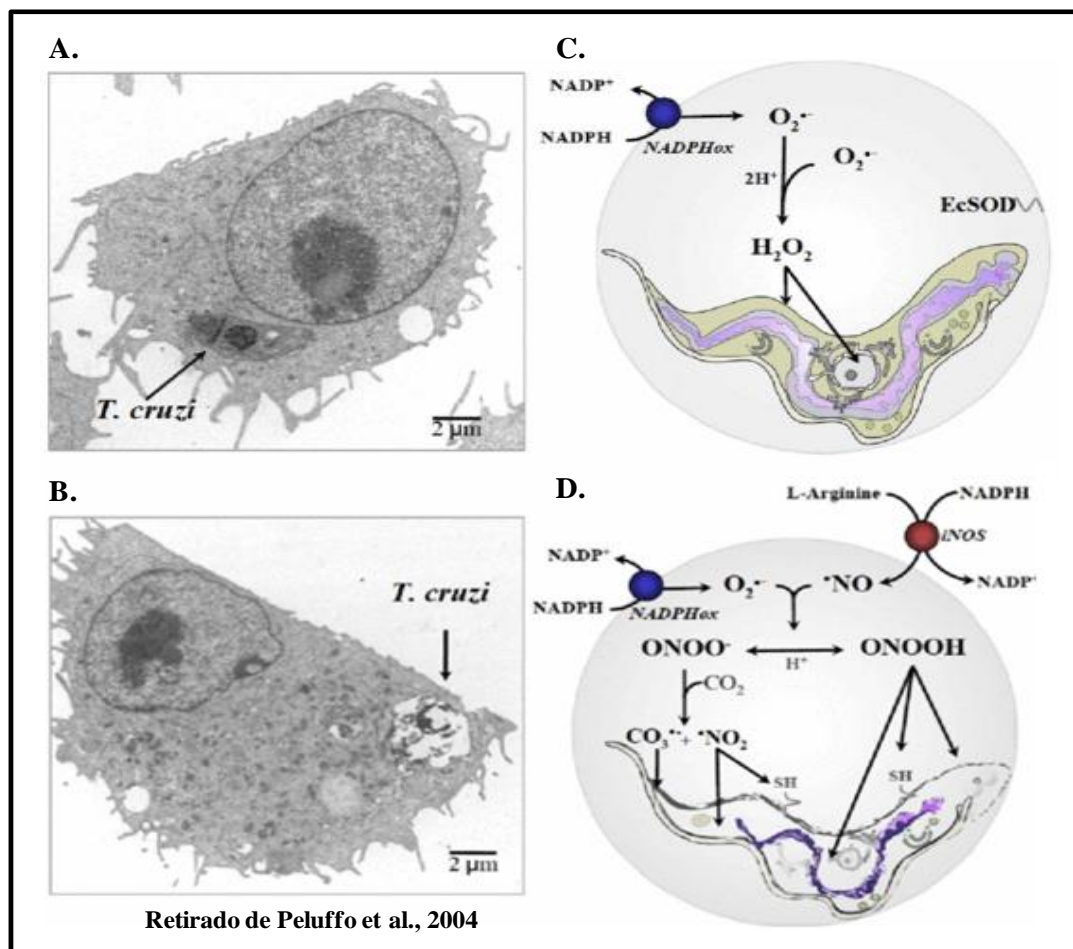


Figura 3: Metabolismo oxidativo de macrófagos infectados com *T. cruzi*. Painéis A e B: Tripomastigotas de *T. cruzi* após a invasão de macrófagos. Panel C: Produção de radicais livres (O_2^- , H_2O_2). Panel D: Produção de NO através da expressão de iNOS utilizando L-arginina como substrato. NADPHox gera O_2^- que interage com NO gerando ONOO⁻ que causam estresse nitro-oxidativo.

1.2.1 Componentes da defesa antioxidante de *T. cruzi*

Os componentes antioxidantes de *T. cruzi* pertencem a um sofisticado sistema associado às vias de redução de derivados NADPH (derivados da via das pentoses fosfato; PPP). As moléculas oxidativas (EROs e NO) são metabolizadas por uma variedade de sistemas de detoxificação enzimática, principalmente através da ditioil tripanotiona (T(SH)₂) e da triparedoxina (TXN). T(SH)₂ é sintetizado pela tripanotiona sintetase (TcTrS), numa reação dependente de ATP, na qual duas moléculas de glutathiona são covalentemente ligadas a espermidina e é mantida num estado reduzido pela tripanotiona redutase (TcTrR) (Fig. 4) (Shames *et al.*, 1986; Carnieri *et al.*, 1993; Irigoín *et al.*, 2008; Krauth-Siegel e Comini, 2008).

T. cruzi apresenta cinco peroxidases, identificadas pela localização subcelular e especificidade de substrato (Fig. 4), sendo a Glutathiona peroxidase-I (TcGPXI, localizada no citosol e no interior do glicossoma) e Glutathiona peroxidase-II (TcGPXII, localizada no retículo endoplasmático) que conferem resistência contra hidroperóxidos exógenos (Wilkinson *et al.*, 2002a, 2002c). As triparedoxina peroxidase citosólica (TcCPX) e mitocondrial (TcMPX), tem a capacidade de detoxificar H₂O₂ e pequenas cadeias orgânicas de hidroperóxidos (Wilkinson *et al.*, 2000). A detoxificação *in vivo* de OONO⁻ exógeno (derivado do macrófago) e OONO⁻ endógeno (derivado do metabolismo do parasito) depende também da atividade de TcCPX e TcMPX (Piacenza *et al.*, 2008). Finalmente, a hemoperoxidase dependente de ascorbato (TcAPX), localizada no retículo endoplasmático, confere resistência contra H₂O₂ (Wilkinson *et al.*, 2002b). Além das diferentes peroxidases, *T. cruzi* apresenta também um repertório de quatro ferro-superóxido dismutases (Fe-SOD) as quais detoxificam O₂⁻ gerado no citosol, glicossomas e mitocôndria (Fig. 4) (Mateo *et al.*, 2008). Este arsenal antioxidante de *T. cruzi* encontra-se dentre os principais fatores de virulência, reduzindo o efeito do estresse nitro-oxidativo durante a infecção pelo parasito (Piacenza *et al.*, 2013).

Existe uma expressão diferencial destas enzimas antioxidantes pelas diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* que foi evidenciada em estudos de análises proteômicas, onde se verificou um aumento de enzimas antioxidantes em tripomastigotas metacíclicos infectantes, quando comparados com os epimastigotas não infectantes (Atwood *et al.*, 2005; Parodi-Talice *et al.*, 2007). Nestes estudos, mostrou-se também que durante a metaciclogênese em distintas cepas de *T. cruzi* ocorre um aumento na síntese de TcCPX, TcMPX e TcTrS, permitindo a pré-

adaptação de *T. cruzi* a um ambiente nitroxidativo, encontrado nas células do hospedeiro vertebrado. A este respeito, foi encontrada uma associação positiva entre a patogenicidade e a síntese das enzimas antioxidantes, destacando a ação destas enzimas e os mecanismos oxidativos do hospedeiro (Piacenza *et al.*, 2009). Da mesma forma, outros trabalhos também demonstraram que cepas altamente infectantes e patogênicas que possuem alta expressão do gene TcCPX foram mais resistentes à morte mediada por macrófagos, principalmente devido à detoxificação do OONO^- (Piacenza *et al.*, 2013; Alvarez *et al.*, 2011). Também foi demonstrado que a alta expressão de enzimas antioxidantes em tripomastigotas aumentou a patogenicidade, com evidência de um aumento de três vezes na parasitemia e aumento no índice de proliferação, com a presença de um maior número de infiltrados inflamatórios no coração (De Souza *et al.*, 2003). Todos estes resultados reforçam o conceito que os níveis de enzimas antioxidantes do parasito influenciam o sucesso da infecção (Piacenza *et al.*, 2013). Em contrapartida, também foi demonstrado que FeSodB citosólico induz a inativação do OONO^- , sugerindo sua participação como uma enzima de defesa antioxidante, enquanto FeSodA mitocondrial pode agir como um sensor do estresse oxidativo (Piacenza, *et al.*, 2013). Devido a estas características únicas, os componentes do sistema antioxidante de tripanosomatídeos foram considerados recentemente como excelentes alvos para o desenvolvimento de drogas contra a doença de Chagas (Turrens *et al.*, 2004).

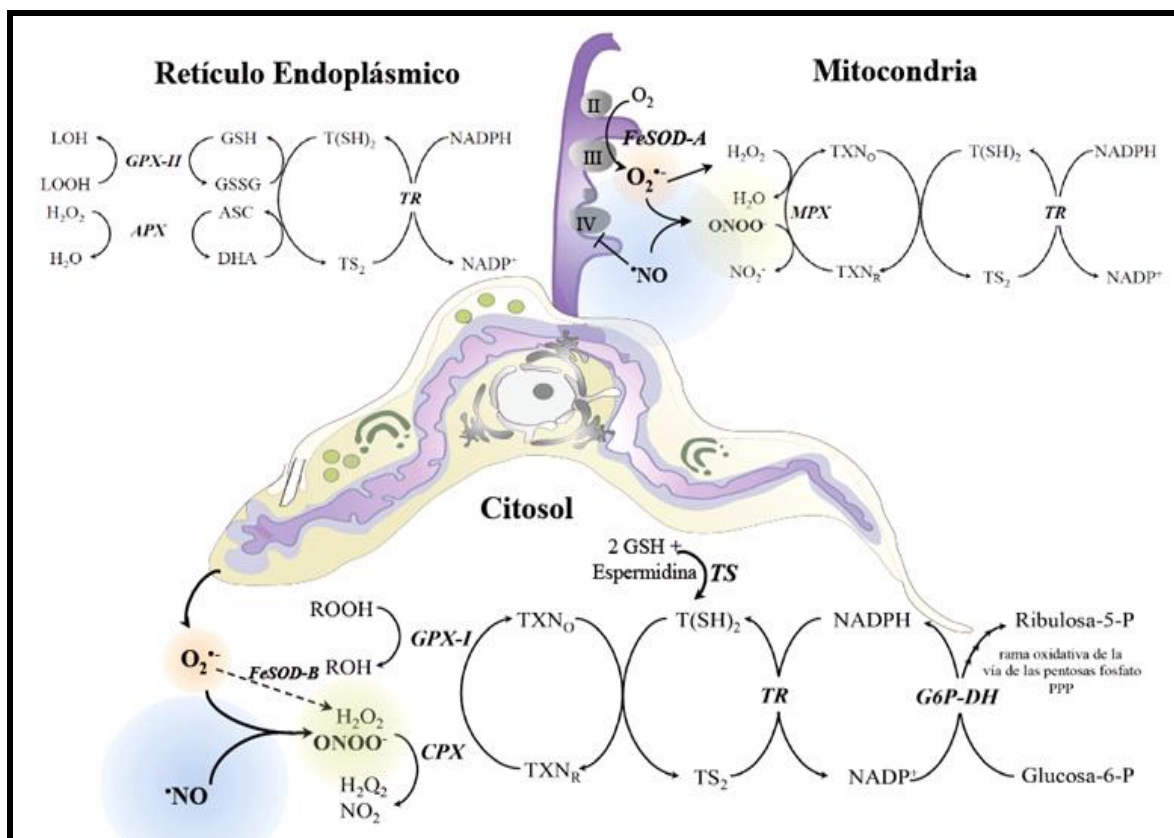


Figura 4: Citotoxicidade de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio contra *T. cruzi*. Distribuição subcelular do arsenal antioxidante de *T. cruzi* no combate a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas pelo hospedeiro. Retirado de Piacenza *et al.*, 2013

1.3 Manifestações clínicas da doença de Chagas

As diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas se devem a vários fatores como: variabilidade genética de *T. cruzi*, forma de transmissão, inóculo de parasitos na infecção inicial, resposta imune do paciente, dentre outros fatores (Andrade *et al.*, 2005; Texeira *et al.*, 2006). As fases clínicas da doença de Chagas (Fig. 5) são divididas em fase aguda, que pode ser assintomática, moderada ou severa e a fase crônica que pode ser dividida na forma indeterminada, cardíaca, digestiva, mista e nervosa (Coura *et al.*, 2007). A fase aguda é geralmente assintomática, mas o paciente pode apresentar sinais como o Chagoma de inoculação (sinal de Romana) ou sintomas inespecíficos como febre, edema, adenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite nos casos severos. Esta fase pode durar de 6 a 8 semanas, na qual se observa elevada parasitemia, embora na grande maioria dos casos a sintomatologia desaparece espontaneamente (Texeira *et al.*, 2006; APT *et al.*, 2008; Moncayo, 2003).

A maioria dos pacientes sobrevive e evolui para uma fase crônica, onde o paciente pode permanecer assintomático ou apresentar manifestações clínicas da doença tais como sintomas cardíacos, digestivos ou até mesmo neurológicos (Coura *et al.*, 1983; Cunha-Neto *et al.*, 1995). Durante a fase crônica, a forma indeterminada é a mais frequente, com ausência de sintomas clínicos, baixa parasitemia, sorologia positiva (aumento dos níveis de anticorpos específicos como as imunoglobulinas IgG), eletrocardiograma e radiografias dentro da normalidade. Aproximadamente 60-70% dos casos de pacientes chagásicos apresentam a forma indeterminada, podendo permanecer assintomáticos durante toda a vida (Coura, *et al.*, 1999; Coura, 2007; APT *et al.*, 2008; Moncayo, 2003), e cerca de 20-40% evoluem para uma fase crônica sintomática apresentando manifestações clínicas tais como cardiomiopatias, megaesôfago ou megacólon.

A diminuição da parasitemia na fase crônica se deve principalmente a ação do sistema imune do hospedeiro que controla a proliferação do parasito. Por outro lado, é possível que as lesões produzidas durante a fase aguda da doença de Chagas possam ter consequências patofisiológicas durante a fase crônica (Andrade, 1990). A avaliação clínica de pacientes na forma crônica sintomática realizada em vários estudos mostraram alterações nos exames eletrocardiográficos e radiológicos do tórax e abdômen. É conhecido que os indivíduos que evoluem para a fase crônica desenvolvem lesões irreversíveis no sistema nervoso autônomo cardíaco (forma cardíaca), no esôfago e em alguns casos no cólon (forma digestiva) (Moncayo, 2003).

A manifestação clínica mais frequente na doença de Chagas é a cardiomiopatia caracterizada pela fibrose miocárdica e cardiomegalia, assim como a insuficiência cardíaca congestiva, as quais representam os maiores índices de mortalidade por esta doença (Higuchi *et al.*, 1993). É importante salientar que uma proporção razoável de indivíduos infectados pode desenvolver manifestações clínicas digestivas caracterizadas pelos megacólon e megaesôfago; mas a grande maioria dos casos crônicos apresentam problemas cardiovasculares que podem levar à morte do indivíduo (Rocha *et al.*, 2003). Até o momento, não se conhece os fatores determinantes das formas clínicas do paciente, que sejam derivados do parasito ou do hospedeiro. No Peru, 95% dos casos agudos são assintomáticos. Dos casos agudos sintomáticos, o sinal de Romãna pode ocorrer em apenas 20%, sendo mais frequente a febre confundida muitas vezes com outras doenças como Malária (Cabrera *et al.*, 2009). Além disso,

casos de miocardite aguda já foram relatados no Hospital Geral de Arequipa (Náquira e Cabrera, 2009; Fernán-Zegarra, 1972). Já as formas crônicas descritas no Peru foram semelhantes aos descritos em outros países endêmicos.

O diagnóstico da doença de Chagas na fase aguda se baseia na procura do parasito por métodos sensíveis como a prova de esfregaço, gota espessa, microtitulação, xenodiagnóstico, hemocultura, PCR e busca de IgM anti-*T. cruzi*. Na forma crônica, são utilizados testes sorológicos para a detecção de anticorpos IgG específicos contra o parasito, sendo os métodos mais frequentes o ELISA e IFI, com uma sensibilidade de 95 a 98%. O PCR é recomendado para os casos de transmissão congênita (Vega e Náquira, 2006). Poucos trabalhos referentes ao diagnóstico da doença de Chagas na cidade de Arequipa mostraram uma prevalência de anticorpos de 0,73% em recém-nascidos de mães chagásicas (Mendoza *et al* 2005) e 10,25% na população adulta (Sanchez *et al.* 2007). Para o tratamento da doença de Chagas nesta área, unicamente Benzimidazole é usado, sendo que este fármaco apresenta uma eficácia relativamente baixa durante a fase crônica com acentuada toxicidade (Bern, 2011; Urbina, 2010).

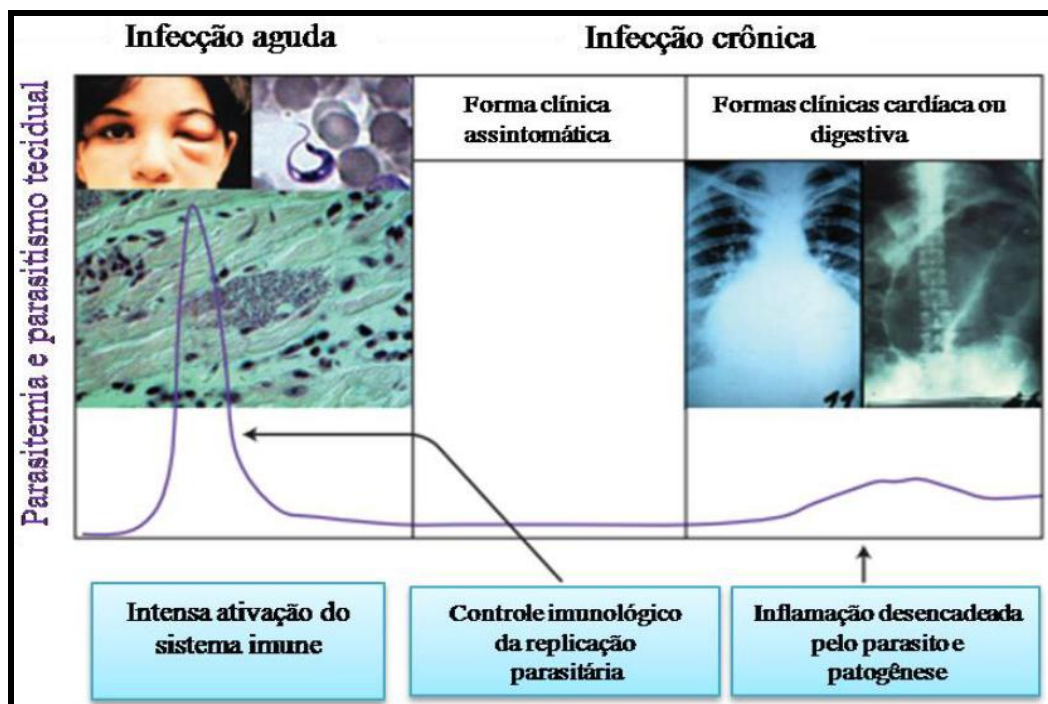


Figura 5: Gráfico representativo de parasitemia e parasitismo tecidual causado por *T. cruzi* durante as fases aguda e crônica da Doença de Chagas.

Retirado de Junqueira 2010.

1.4 Resposta imune na doença de Chagas

As manifestações clínicas da doença de Chagas são em parte decorrentes das respostas imunes produzidas pelos próprios hospedeiros contra o parasito (Brodskyn e Barral-Netto, 2000). As respostas imunes são específicas em cada uma das fases da infecção, onde atuam células do sistema imune, citocinas, quimiocinas e proteínas que controlam a replicação parasitária tecidual e protegem o organismo. Por outro lado, esta resposta imune inicial pode também estar envolvida no desenvolvimento da patologia chagásica na fase crônica da doença (Lopes, 1997). Neste contexto, foram realizados vários trabalhos de infecção experimental, buscando entender melhor os mecanismos envolvidos na resposta imune do hospedeiro frente à infecção por *T. cruzi*.

Segundo Ferreira *et al.*, (2002), a imunidade inata no início da infecção experimental induz a hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e atrofia dos linfonodos mesentéricos e do timo. Do mesmo modo, Brener e Gazzinelli, (1997), mostraram que as alterações da fase aguda são devidas a ativação de linfócitos T e B, hipergamaglobulinemia, seguida de imunossupressão da resposta linfocitária e aumento da apoptose. Assim também Reis e Lopes, (2000), mostraram que a imunidade no início da infecção promove a diminuição da replicação parasitária e ativação de linfócitos LTCD4⁺, os quais induzem a ativação e migração de outras células para o local da infecção. Vários estudos de infecção experimental mostraram que linfócitos TCD4⁺ ativam macrófagos teciduais e promovem à proliferação de linfócitos TCD8⁺ e linfócitos B. A deficiência destas células pode promover uma redução global da resposta imune do hospedeiro e deste modo ocasionar um aumento do parasitismo tecidual (Rottenberg *et al.*, 1995; Gonçalves da Costa *et al.*, 2002). Porém, a ativação dos macrófagos induz a produção de várias citocinas pró-inflamatórias que reduzem a parasitemia, parasitismo tecidual e a mortalidade. (Gazzinelli *et al.* 1992; Brener e Gazzinelli, 1997; Holscher *et al.*, 1998).

T. cruzi é um parasito cardiotrópico, neste sentido o tecido cardíaco pode também participar ativamente frente à infecção, além de modular as respostas inflamatórias e controlar a replicação do parasito (Machado *et al.*, 2000). Em vários estudos foi relatada a integração dos cardiomiócitos na resposta inflamatória durante a infecção por *T. cruzi*. Estas células podem produzir NO, além de citocinas e quimiocinas, sendo estas últimas ativadoras de LTCD4⁺ e LTCD8⁺ que controlam a replicação intracelular do parasito. Estudos como o de Zhang e

Tarleton (1996), demonstraram a presença do mRNA da enzima iNOS e de citocinas pró-inflamatórias em corações de camundongos infectados com a cepa Brasil de *T. cruzi*.

Os linfócitos TCD4⁺ podem dividir-se em 4 subpopulações (linfócitos T helper ou Th1, Th2, Th17 e T reguladores – Treg) e são caracterizados pela secreção de um grupo particular de citocinas. Linfócitos Th1 sintetizam principalmente Interferon gama (IFN- γ) que atua frente a patógenos intracelulares; Th2 sintetizam Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-5 (IL-5) e Interleucina-13 (IL-13) que promovem a destruição de patógenos através de anticorpos IgE e de eosinófilos (Mosmann *et al.*, 1986); Th17 sintetizam IL-17 e IL-22 participando na defesa de patógenos extracelulares (Aggarwal *et al.*, 2003, Murphy *et al.*, 2003) e finalmente os Treg sintetizam principalmente IL-10 e TGF- β que têm um papel fundamental na manutenção e controle de uma resposta imune exacerbada frente a patógenos (Chen *et al.*, 2003; Sakaguchi *et al.*, 2006.). Do mesmo modo, Araujo *et al.* (2007) investigaram a expressão intracelular da IL-10, sugerindo que esta citocina pode controlar o desenvolvimento da doença em pacientes com a forma indeterminada mas não em pacientes com a forma cardíaca.

Estudos de infecção experimental como o de Roggero *et al.* (2002) mostraram que em camundongos resistentes e sensíveis ao *T. cruzi*, a disparidade na síntese de citocinas pró e anti-inflamatórias foi o principal motivo associado com o aumento da morbidade nestes camundongos e não a carga parasitária. A síntese de citocinas pró-inflamatórias (INF- γ , TNF- α e IL-12) durante a infecção por *T. cruzi* tem um papel importante no controle da replicação do parasito, principalmente na fase aguda da doença de Chagas, mas são produzidas em quantidades elevadas durante a fase crônica, devido ao longo período de exposição ao parasito (Ribeirão *et al.*, 2000; Abel *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2003). Assim também, outros trabalhos como de Gomes *et al.*, (2003) e Talvani *et al.*, (2004) demonstraram que a progressão da severidade da lesão cardíaca está associada com o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α . Contrariamente, trabalhos como de Laucella *et al.* (2004) demonstraram que a cardiomiopatia teve uma correlação negativa com a expressão de IFN- γ .

No entanto, vários trabalhos como os expostos previamente, demonstraram que a síntese e aumento gradativo do INF- γ poderia determinar a recuperação do hospedeiro mamífero frente à infecção por *T. cruzi*, embora uma exacerbada síntese possa promover lesões em órgãos como o coração. Neste contexto, a imunomodulação destas citocinas se torna um mecanismo importante que pode determinar a morbidade da doença de Chagas. A produção de citocinas

anti-inflamatórias como IL-10, está envolvida no controle da imunopatologia (Bahia-Oliveira *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2003). A IL-10 inibe a produção de outras citocinas pró-inflamatórias como o INF- γ ; além disso, é responsável pelo controle da inflamação e imunopatogenia observados nos tecidos cardíacos na infecção experimental pelo *T. cruzi* (Talvani *et al.*, 2004). Estudos experimentais de infecção com as cepas Tulahuén, CL e Brasil mostraram que a produção de IFN- γ foi similar entre animais resistentes e susceptíveis. Por outro lado, verificou-se que a produção de IL-10 foi maior em animais susceptíveis, infectados com as cepas Tulahuén e CL (Reed *et al.*, 1994; Minoprio *et al.*, 1993) e em animais resistentes, infectados com a cepa Brasil (Zhang e Tarleton, 1996), sugerindo um mecanismo alternativo de regulação, onde a IL-10 bloqueia a diferenciação de linfócitos Th0 para Th1.

1.5 Infecção experimental do modelo camundongo

Em condições naturais, *T. cruzi* pode infectar mais de 100 espécies de mamíferos, incluindo o homem (Texeira *et al.*, 2001). As diferentes linhagens de camundongos são consideradas excelentes modelos para a infecção experimental e para avaliar a imunidade celular e humoral produzida por *T. cruzi*. Em vários estudos foi demonstrada a existência de linhagens altamente resistentes e sensíveis à infecção por este parasito, reforçando o conceito que fatores genéticos do hospedeiro estão envolvidos no desenvolvimento de imunidade protetora na infecção pelo parasito (Hoft *et al.*, 1993).

O modelo camundongo tem sido amplamente utilizado para estudos de infecção experimental com *T. cruzi*, devido a sua fácil manipulação e também porque eles mimetizam em alguns aspectos a doença humana, como os mecanismos de dano tecidual (Díaz-Limay *et al.*, 2004; Valenzuela *et al.*, 2010; Andrade e Magalhaes, 1996; Andrade *et al.*, 1999). Estudos preliminares de infecção *in vivo* descreveram a linhagem C57BL6 como uma das mais resistentes (Pizzi *et al.*, 1948), sendo utilizado na infecção por diferentes cepas de *T. cruzi* (Reed *et al.*, 1984; Silva *et al.*, 1995; Tarleton, 1995). O fato de ser mais resistentes à infecção por diferentes cepas de *T. cruzi* faz deste um modelo excelente de cronificação da doença (Postan *et al.*, 1984, 1987a). Por outro lado, durante a infecção experimental é importante conhecer a virulência das cepas de *T. cruzi*, inclusive para a linhagem resistente C57BL6 (Luz *et al.*, 1994).

Como descrito acima, durante a fase aguda da doença de Chagas se produz uma estimulação excessiva do sistema imune que promove uma forte ativação de linfócitos, o que desencadeia intenso processo inflamatório todos ligados com o aumento da parasitemia. Durante a imunidade adquirida, ocorre o controle da parasitemia e da carga parasitária tecidual. Neste sentido, estudos prévios com a cepa Brasil de *T. cruzi* (Wrightsmann *et al.*, 1982) mostraram que camundongos com altos níveis de parasitemia na fase aguda morrem em um período curto de tempo, enquanto aqueles que apresentaram baixos níveis sobrevivem à infecção. Estes resultados sugerem que a magnitude da parasitemia pode ser um fator responsável pela morte destes camundongos. Em contrapartida, neste mesmo estudo foi demonstrado que camundongos resistentes da linhagem B10.S, infectados com a cepa Peru de *T. cruzi*, apresentaram níveis de parasitemia semelhantes ou superiores aos de camundongos susceptíveis. É importante considerar que diferentes variáveis durante a fase aguda da doença de Chagas tais como a parasitemia e o parasitismo cardíaco dependem grandemente da cepa infectante (Andrade e Ramalho, 1966; Andrade, 1990). Desta forma, estudos de infecção com cepas de *T. cruzi* como a Colombiana mostraram baixa parasitemia nos primeiros dias após infecção inicial e um aumento progressivo destes níveis após do dia 21 de infecção (Reis Machado *et al.*, 2014). Outros estudos de infecção de camundongos sensíveis, como a linhagem BALB/c com o clone CL Brener de *T. cruzi*, mostraram altos níveis de parasitemia e carga parasitária no tecido cardíaco, assim como um aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias com maiores taxas de mortalidade devida provavelmente a uma resposta inflamatória sistêmica (Rodrigues *et al.*, 2010).

Os mecanismos de controle da replicação parasitária durante a fase aguda da doença de Chagas são pouco entendidos. Embora vários estudos de infecção experimental tenham demonstrado a função de algumas citocinas (IFN- γ , TNF- α e IL-12) na resistência ao *T. cruzi* (Torrice *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 1992; Hunter *et al.* 1996), outros mostraram que na infecção da linhagem C57BL/6 com a cepa Colombiana houve um aumento de IFN- γ no início da infecção sendo predominante apenas do décimo quinto ao trigésimo dia. Em outros estudos, camundongos BALB/c foram infectados com a cepa Talahuén de *T. cruzi* e foi observado que as células do baço liberam IFN- γ na segunda semana de infecção, enquanto que a infecção de camundongos C3H/He, resistentes à infecção, produzem IFN- γ dois dias após serem infectados (Antúñez e Cardoni, 2001).

2 JUSTIFICATIVA

T. cruzi apresenta uma grande variabilidade genética e atualmente as cepas deste parasito estão divididas em seis DTUs, as quais diferem quanto às capacidades infectantes, patogênicas e imunogênicas (Murta e Romanha, 1999; Neira *et al.*, 2002; Zingales *et al.*, 2009). Em Arequipa, Peru, a doença de Chagas apresenta características únicas, como a baixa sensibilidade aos métodos de diagnóstico convencionais e sintomatologia inexistente principalmente na fase aguda (Mendoza *et al.* 2005). É possível que essas características sejam decorrentes da menor capacidade antigênica, infectante e patogênica da cepa de *T. cruzi* que circula nesta região, quando comparada com cepas encontradas em outras partes da América Latina (Verani *et al.*, 2009).

Alguns fatores intrínsecos ao parasito já foram associados à virulência de *T. cruzi* como a linhagem evolutiva, resistência ao estresse oxidativo e perfil induzido de resposta imune. Apesar de não existir uma associação inequívoca entre linhagem do parasito e infectividade, de maneira geral, cepas do grupo DTU TcI tendem a ser menos virulentas, enquanto que cepas do grupo DTU TcVI tendem a ser altamente infectantes (Yoshida *et al.*, 2006). Também já foi demonstrado que, em resposta à infecção por *T. cruzi*, os macrófagos promovem um estresse nitrooxidativo que pode eliminar o parasito através da produção de NO e EROs (Turrens, 2003). Trabalhos como de Piacenza *et al.*, (2008; 2009), mostraram que cepas de *T. cruzi* altamente infectantes e patogênicas tem alta expressão de enzimas antioxidantes, o que confere proteção ao parasito frente à resposta efetora dos macrófagos. Vários trabalhos também demonstraram que o tipo de resposta imune induzida por *T. cruzi*, como o balanço na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias influenciam os níveis de parasitemia e parasitismo tecidual, bem como o dano tecidual provocado pela resposta imune, que pode ser determinante na patogênese chagásica. Neste sentido, torna-se importante avaliar a resposta imune em camundongos infectados com a cepa Arequipa, uma vez que ainda não existem dados da resposta imune na infecção com esta cepa. Neste trabalho propomos investigar a influência dos níveis de enzimas antioxidantes na capacidade infectante de cepa Arequipa e compará-los com aqueles da cepa Colombiana, da mesma linhagem, e do clone CL Brener, pertencente ao DTU TcVI. Visamos também avaliar o perfil de indução de expressão de citocinas na infecção experimental por estas cepas de *T. cruzi*. Estes estudos poderão contribuir para um melhor entendimento dos fatores genéticos e imunogênicos associados com à capacidade infectante da cepa Arequipa de *T. cruzi*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

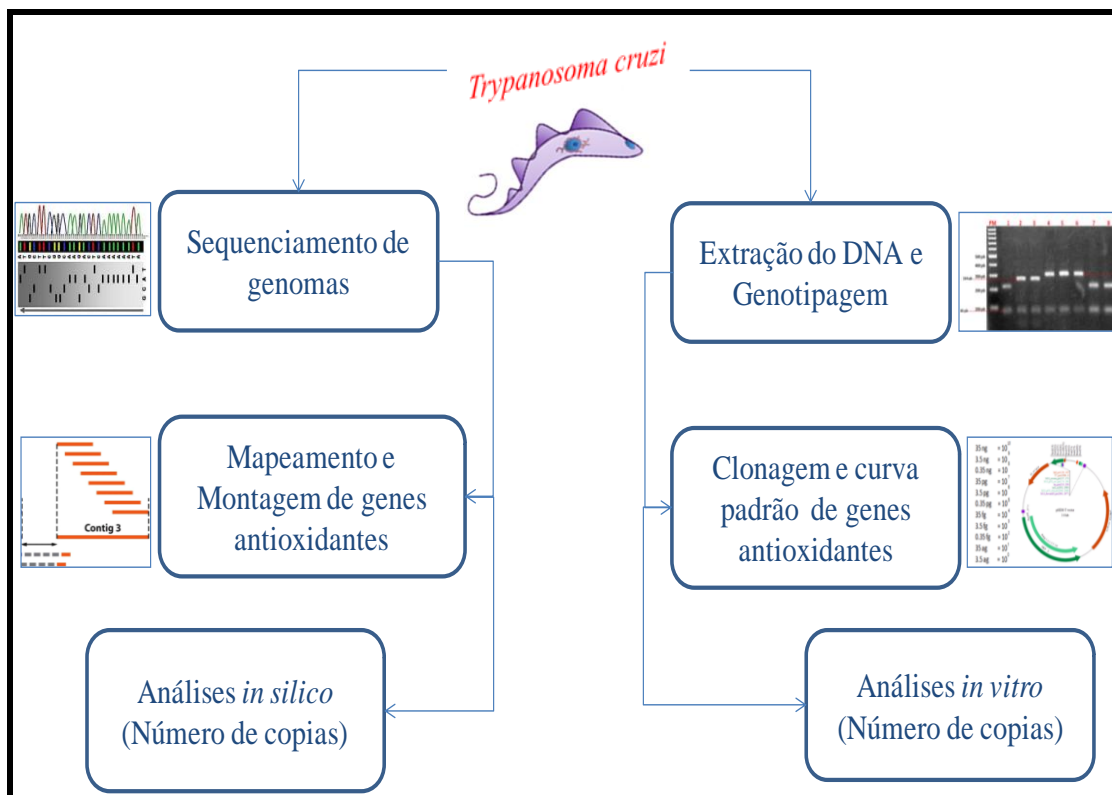
- Caracterizar a capacidade infectante e a defesa antioxidante de *Trypanosoma cruzi* isolado numa área endêmica do Peru – Arequipa em infecções *in vitro* em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e durante a infecção experimental *in vivo* de camundongos C57BL/6.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

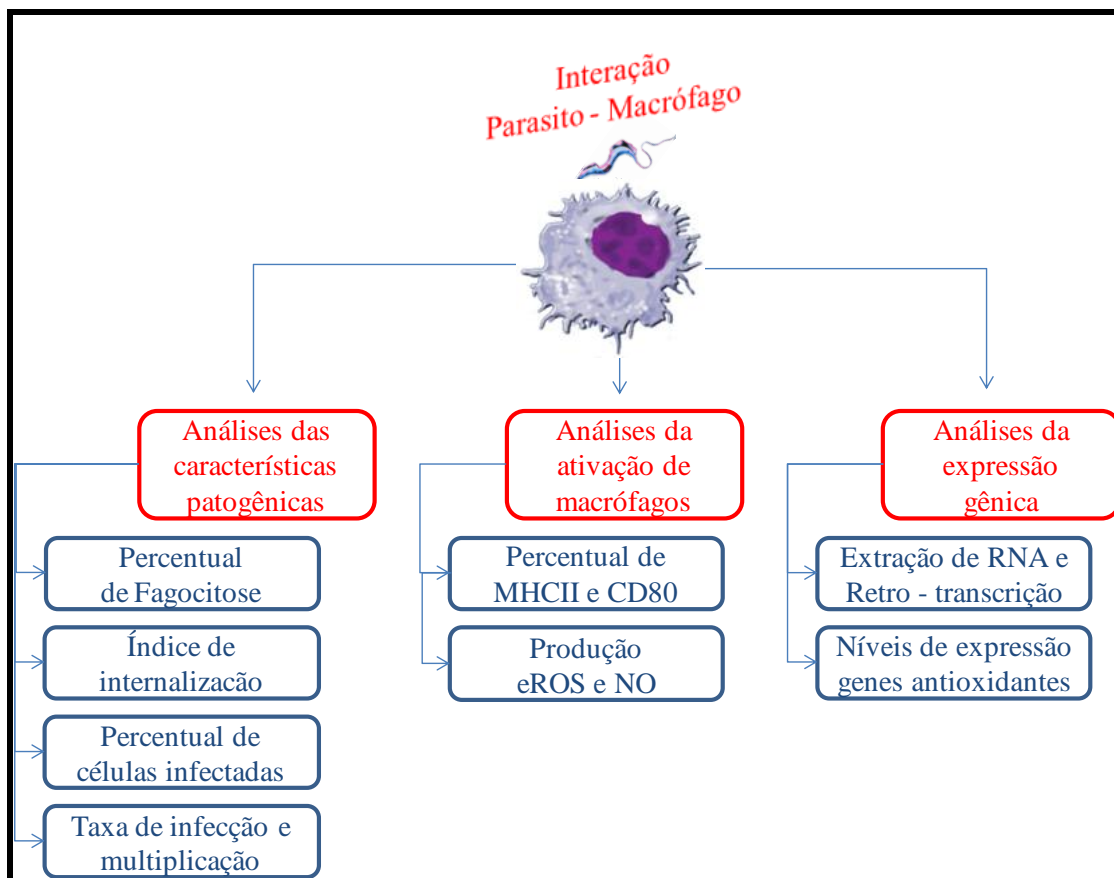
- Caracterizar o genótipo (DTU) da cepa Arequipa de *T. cruzi*.
- Avaliar comparativamente a infectividade *in vitro*, em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, das cepas Arequipa, Colombiana e do clone CL Brener de *T. cruzi* (percentual de fagocitose, índice de internalização, taxa de infecção e taxa de multiplicação).
- Caracterizar o perfil de ativação de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com as cepas Arequipa, Colombiana e com o clone CL Brener de *T. cruzi* pela presença das moléculas de superfície MHCII e CD80 e através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO).
- Avaliar o número de cópias *in silico* e *in vitro* dos genes antioxidantes, TcAPX, TcCPX, TcMPX, TcSodA, TcSodB, TcTrR e TcTrS, das cepas Arequipa, Colombiana e do clone CL Brener de *T. cruzi*.
- Determinar os níveis de expressão dos transcritos das enzimas antioxidantes: TcAPX, TcCPX, TcMPX, TcSodA, TcSodB, TcTrR e TcTrS, das cepas Arequipa, Arequipa – RE, Colombiana e do clone CL Brener de *T. cruzi*.
- Avaliar a parasitemia e carga parasitária tecidual em órgãos (coração, colón e músculo esquelético) de camundongos C57BL6 infectados com as cepas Arequipa–RE, Colombiana e com o clone CL Brener de *T. cruzi*.
- Avaliar a expressão de citocinas IL-10, IL-12, INF- γ e TNF- α em tecido cardíaco de camundongos C57BL6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e com o clone CL Brener de *T. cruzi*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

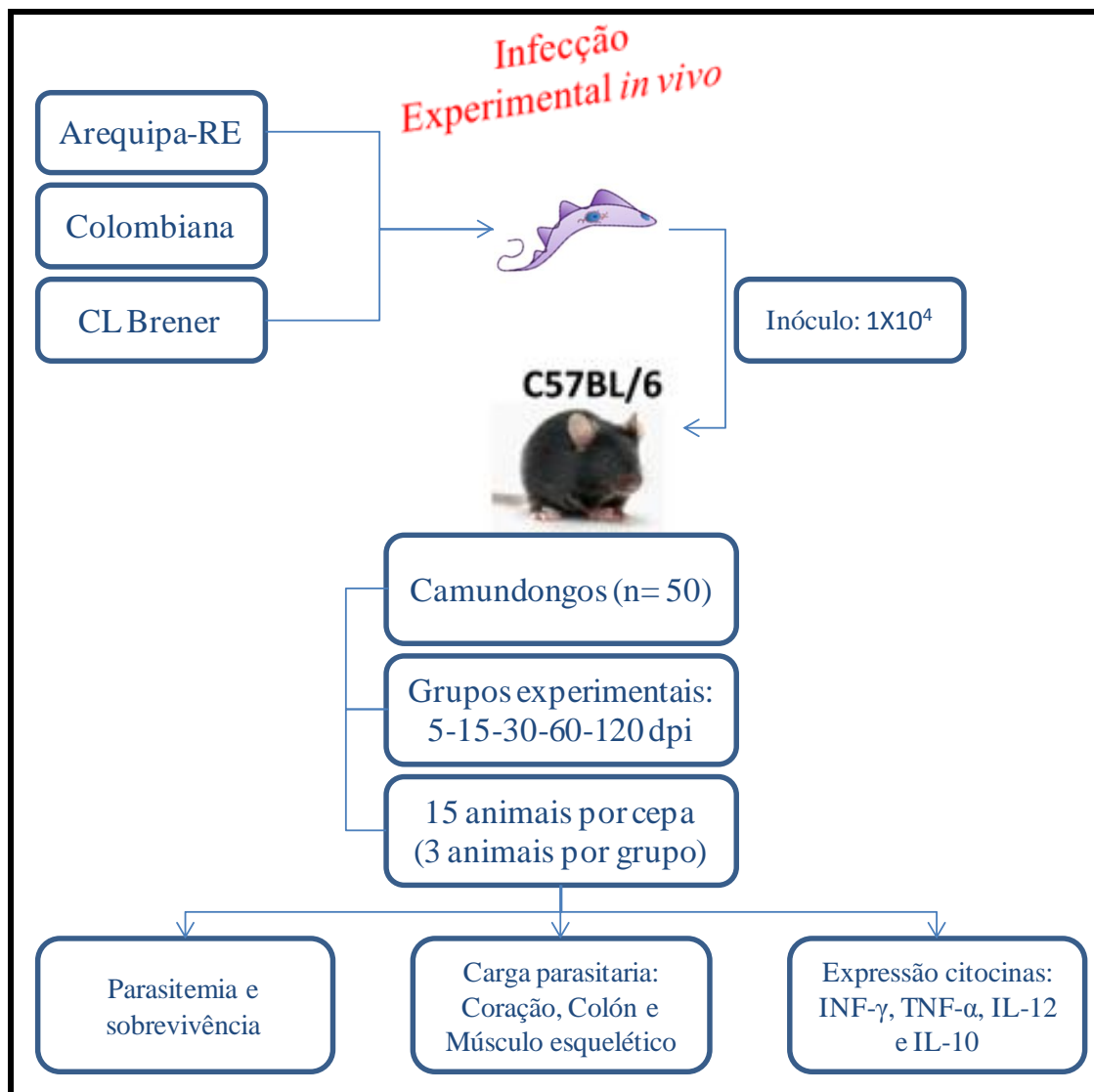
4.1 Desenho representativo da metodologia



Quadro 1: Desenho esquemático das metodologias referentes aos objetivos um e quatro deste trabalho. Para o primeiro objetivo foram realizadas as técnicas de extração do DNA e genotipagem. Para a realização do objetivo quatro foram realizadas as técnicas de sequenciamento genômico, mapeamento e montagem dos genes antioxidantes para avaliação *in silico* e a clonagem destes genes para avaliação *in vitro*.



Quadro 2: Desenho esquemático das metodologias referentes aos objetivos dois, 3 e cinco deste trabalho. Para o segundo objetivo foi realizado a técnica de citometria de fluxo para avaliar o percentual de fagocitose e a cinética de infecção para avaliar o índice de internalização, percentual de células infectadas e as taxas de infecção e multiplicação do parasito. Para o terceiro objetivo foi realizado a técnica de citometria de fluxo para avaliar o percentual de moléculas MHC-II e CD80 e a produção de EROs e NO. Para o quinto objetivo foi realizado a técnicas de RT- *PCR Real time* para avaliar os níveis de expressão dos genes antioxidantes de *T. cruzi*.



Quadro 3: Desenho esquemático das metodologias referentes aos objetivos seis e sete deste trabalho. Para o sexto objetivo foi realizado a infecção de camundongos C57BL/6, para avaliar a parasitemia e sobrevivência, assim como o parasitismo tecidual, verificando a carga parasitária no coração, colón e músculo esquelético. Para o sétimo objetivo foi realizado a análise de expressão gênica para avaliar os níveis de citocinas pró-inflamatórias (INF- γ , TNF- α e IL-12) e anti-inflamatória (IL-10).

4.2 Obtenção e cultivo das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Neste trabalho a cepa Arequipa de *T. cruzi* foi isolada de “La Joya”, região localizada a 917 metros acima do nível do mar e a uma latitude de 71° oeste da cidade de Arequipa no sul do Peru. Este parasito foi isolado a partir do conteúdo intestinal do vetor *Triatoma infestans* em meio NNN + LIT (*McNeal, Novy & Nicolle + Liver Infusion Tryptose*), um meio bifásico que possui como fase sólida o meio ágar sangue (NaCl 0,6%; Agar 1,4%; sangue humano desfibrinado e inativado 15%) e como fase líquida o meio LIT (NaCl 0,4%; KCl 0,04%; Na₂HPO₄ 0,8%; Glicose 0,2%; Tryptose 0,5%; Infuso de fígado 0,5%, Hemina 0,0025%; Soro Fetal Bovino 20%; Penicilina 100 unidades/mL; Estreptomicina 100 mg/mL; Ampicilina 10 mg/mL; Gentamicina 10 mg/mL; pH 7,2). Posteriormente a cultura de epimastigotas foi submetida a condições de exaustão de nutrientes utilizando meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*; NaCl 190 mM, KCl 17mM, MgCl₂ 2mM, CaCl₂ 2 mM, Tampão fosfato pH 6,0 8mM e NaHCO₃ 0,6 mM) e posteriormente acrescentando o meio TAU3AAG (*Triatomine Artificial Urine* adicionado com aminoácidos essenciais; Glicose 10mM, L-Prolina 10mM, Glutamato de sódio 50 mM e Aspartato de sódio 2mM), visando promover a metaciclogênese ou a diferenciação de formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas (Araújo, 2007).

Neste trabalho também foram utilizados a cepa Colombiana e o clone CL Brener. As formas epimastigotas foram cedidas originalmente pelo grupo do Dr. Égler Chiari, do Departamento de Parasitologia no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG). As formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram mantidas em meio *Liver Infusion Tryptose medium* (LIT) suplementado com 10% de soro bovino fetal a 28°C em incubadora (*Eletrolab* ® EL 101/2). A cultura celular das formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi mantida em estufa a 37°C e 5 % de CO₂ na presença de RPMI 1640 suplementado com antibióticos (penicilina 60mg/L e estreptomicina 10 mg/L) e soro fetal bovino (SFB) (*Vitrocell/Embriolife*) a 10%. A manutenção celular foi realizada com repiques contínuos de infecção com tripomastigotas de *T. cruzi*, em monocamada de células imortalizadas do mioblasto de rato (L6), a cada 7 dias numa proporção 5 parasitos/1 célula hospedeira (5:1).

4.3 Extração do DNA das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Para a extração de DNA, cinco mililitros de cultura de *T. cruzi*, em fase exponencial de crescimento (5×10^7 parasitos/ml), foram centrifugados a 2800g por 10 minutos a 4°C, seguida por duas lavagens em PBS pH 7,4. O sedimento contendo os parasitos foi ressuscitado em 300 µL de PBS. Posteriormente foi adicionado 10 µL de proteinase K (50 µg/mL) e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Para a extração total do DNA foi utilizado o “Wizard Genomic DNA Purification Kit” seguindo as instruções do fabricante com algumas modificações. A qualidade e pureza do DNA obtido foi avaliada utilizando o NanoDrop 2000c “Thermo Fisher Scientific” inferidos pelas razões das leituras de absorbância a 260/280 nm e 260/230 nm, respectivamente.

4.4 Genotipagem das cepas Arequipa, Colombiana, clone CL Brener e de diferentes isolados de *T. cruzi*

Para os ensaios de genotipagem foram utilizadas amostras de DNA purificado das cepas e clone de *T. cruzi* avaliados neste estudo, bem como o DNA de outros isolados provenientes de diferentes regiões geográficas da América do Sul, conforme indicado na Tabela 1. Estes parasitos foram genotipados segundo o protocolo de D’Avila *et al.*, 2009, onde se propõe a utilização da metodologia combinada em 3 etapas através de PCR utilizando os polimorfismos dos genes citocromo oxidase II (COII) (De-Freitas *et al.*, 2006), rDNA 24Sα (LSUrDNA) (Souto *et al.*, 1996) e mini-exon SL-IRac (Burgos *et al.*, 2007) (Fig. 6). Para as reações de PCR foram utilizados Tampão GoTaq 1X, 1,5 mM MgSO₄, 40 uM dNTPs, 0,75 U Taq, 10 pM de cada *primer* e 100ng do DNA genômico dos parasitos. Cada um dos marcadores é amplificados usando um programa de PCR diferente, conforme indicado na Tabela 2. O *amplicon* do marcador COII foi posteriormente digerido com a enzima de restrição *AluI* (PCR-RFLP) com a finalidade de determinar o haplótipo correspondente das diferentes cepas de *T. cruzi*. Brevemente, foi utilizado *AluI* na proporção de 1U para cada 20 µL do produto amplificado pela reação de PCR e posteriormente submetido à incubação a 37°C por 12-16 horas. Para a análise dos resultados, as amostras resultantes das amplificações e das digestões foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% e visualizadas pela fluorescência do brometo

de etídio (0,3 µg/µL). Para a correta genotipagem dos parasitos, os padrões de bandas obtidos nos géis foram comparados com aqueles específicos para cada linhagem do parasito.

Tabela 1: Isolados de *T. cruzi* provenientes de diferentes regiões geográficas, utilizados nos ensaios de genotipagem.

| Cepa | ID | Hospedeiro/Vetor | Localização |
|------------|----------------|---------------------------|---------------------------|
| CH23 | Chaco23 C14 | <i>Triatoma infestans</i> | Pr. Hayes, Paraguai |
| COLOMBIANA | Colombiana C11 | <i>Homo sapiens</i> | Colômbia |
| ERA | ERA C12 | <i>Homo sapiens</i> | Anzoategui, Venezuela |
| BUG2148 | Bug2148 C11 | <i>Triatoma infestans</i> | Rio Grande do Sul, Brasil |
| CL BRENER | CL Brener C11 | <i>Triatoma infestans</i> | Rio Grande do Sul, Brasil |
| Y | Y | <i>Homo sapiens</i> | São Paulo, Brasil |
| AREQUIPA | AQP300 | <i>Triatoma infestans</i> | Arequipa, Peru |
| VIERA | Viera Roque | <i>Homo sapiens</i> | Bolívia |

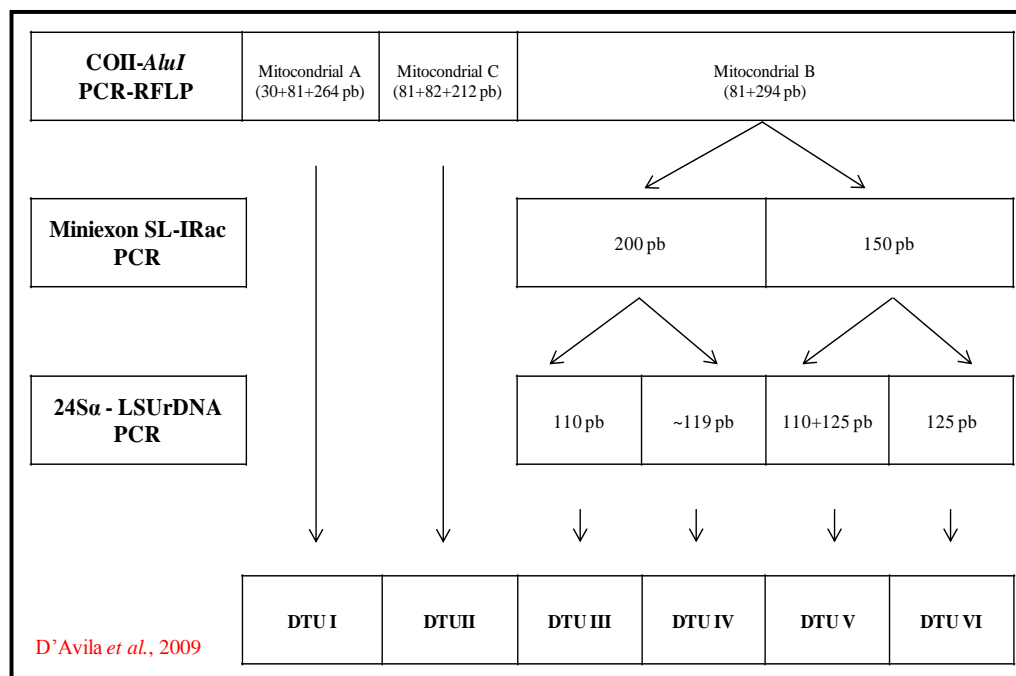


Figura 6: Protocolo para a genotipagem do *T. cruzi*, proposto por D'Avila et al., 2009, usando a metodologia de 3 passos. Polimorfismo dos marcadores genéticos: rDNA 24Sα (LSUrDNA), Citocromo Oxidase II (COII) e Mini-exon SL-IRac.

Tabela 2: *Primers* e programas de amplificação dos marcadores utilizados na genotipagem dos parasitos.

| | COII | Mini-Exon | rDNA 24 Sα |
|----------------------------|---------------------------------|---|----------------------------------|
| Primer forward | 5'-CCATATATTG TTGCATTATT-3' | 5'-CGTACCAATATA GTACAGAAACTG-3' | 5'-AAGGTGCGTC GACAGTGTGG -3' |
| Primer reverse | 5'-TTGTAATAGG AGTCATGTTT -3' | 5'-CTCCCCAGTGT GGCCTGGG -3' | 5'-TTTTCAGAATG GCCGAACAGT -3' |
| Denaturação inicial | 94 °C por 5 min | 94 °C por 3 min | 94 °C por 10 min |
| Denaturação | 94 °C por 45s | 94 °C por 1 min | 94 °C por 30 s |
| Anelamento | 45 °C por 45s | 68 °C por 1 min (2 Ciclos) 66 °C por 1 min (2 Ciclos) 64 °C por 1 min (2 Ciclos) 62 °C por 1 min (2 Ciclos) 60 °C por 1 min (35 Ciclos) | 60 °C por 30 s |
| Extensão | 72 °C por 1 min | 72 °C por 1 min | 72 °C por 30 s |
| Número de ciclos | 40 | 43 | 30 |
| Extensão final | 72 °C por 1 min | 72 °C por 1 min | 72 °C por 30 s |

4.5 Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c

Macrófagos do peritônio de camundongo BALB/c foram obtidos e utilizados para os ensaios de invasão e multiplicação parasitária. Para obtenção dos macrófagos peritoneais, os camundongos foram inoculados, via intraperitoneal (i.p.) com 2 mL de tioglicolato a 3% com o intuito de induzir uma inflamação (Gordon *et al.*, 1974). Após 3 a 4 dias, os animais foram eutanasiados e foi injetado 5 mL de PBS + 1% Heparina Sódica (5000 UI/mL) gelado e estéril na cavidade peritoneal. Posteriormente realizou-se uma massagem abdominal e foi retirado o PBS contendo os macrófagos, com auxílio de pipeta *Pasteur*. As células foram mantidas no gelo e foram centrifugadas a 260 g por 10 minutos a 4°C e lavadas com PBS gelado para serem centrifugadas novamente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em RPMI +

10% de SFB. Finalmente as células foram incubadas em placas 24 poços de fundo chato, em garrafas de 50 ml ou colocadas em tubos de cultura, para serem utilizadas nas avaliações deste trabalho.

4.6 Avaliação da fagocitose das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c

Para a avaliação da fagocitose, *in vitro*, macrófagos peritoneais foram obtidos como descrito no item 4.5 e colocados em tubos de cultura numa concentração de 1×10^6 células/ml. As células foram então incubadas *overnight* em estufa a 37°C e 5% CO₂, posteriormente lavadas 2 vezes com RPMI e infectados com tripomastigotas das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*, numa proporção de 10:1 (parasito/macrófago). Como controle positivo da fagocitose, foi utilizado o zimosan-A (20mg/mL, *Sigma-Aldrich*) o qual é um potente indutor pró-inflamatório (Macrae e Pryzwansky, 1984) que estimula a produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Vasconcelos *et al.*, 2012; Takeuchi *et al.*, 2012).

Previamente à infecção, os tripomastigotas foram ressuspensos em meio RPMI e incubados com éster de *succinimidil-carboxifluoresceína* (CFSE 5mM, *Sigma-Aldrich*), a 37°C, por 10 minutos (Gonçalves *et al.*, 2005). Em seguida, o zimosan-A foi submetido ao mesmo protocolo de marcação com CFSE. Após a marcação com CFSE, os macrófagos foram infectados com os tripomastigotas ou incubados com o zimosan A, durante 3 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Uma vez concluída a infecção ou incubação, a suspensão celular foi lavada com 1 mL de PBS (1X) para retirar parasitos não fagocitados; assim às células foram centrifugadas a 260g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Em seguida acrescentou-se 200 µL de PBS (1X) em cada tubo com a suspensão celular para leitura no citometro de fluxo (*FacScan Becton Dickinson, Mountain View, CA*), onde foram lidos 50.000 eventos dentro do *gate* de macrófagos. As análises dos resultados foram geradas no programa *Flowjo 10.0 (Tree Star, Ashland, OR, EUA)*.

Como parte da metodologia observou-se a marcação dos tripomastigotas de *T. cruzi* com CFSE, desta forma as figuras 7A, B e C representam o perfil de dispersão celular de tamanho *versus* granulosidade dos tripomastigotas de *T. cruzi*, para determinação da região R1.

As figuras 7D, E e F representam tripomastigotas não marcados e as figuras 7G, H e I representam a intensidade da fluorescência de parasitos marcados com CFSE, selecionadas na região R1. Os tripomastigotas marcados com CFSE no quadrante 3 (Q3) representam 85,5%; 90,2% e 84,5% da população selecionada, correspondente a cepa Arequipa, clone CL Brener e cepa Colombiana, respectivamente.

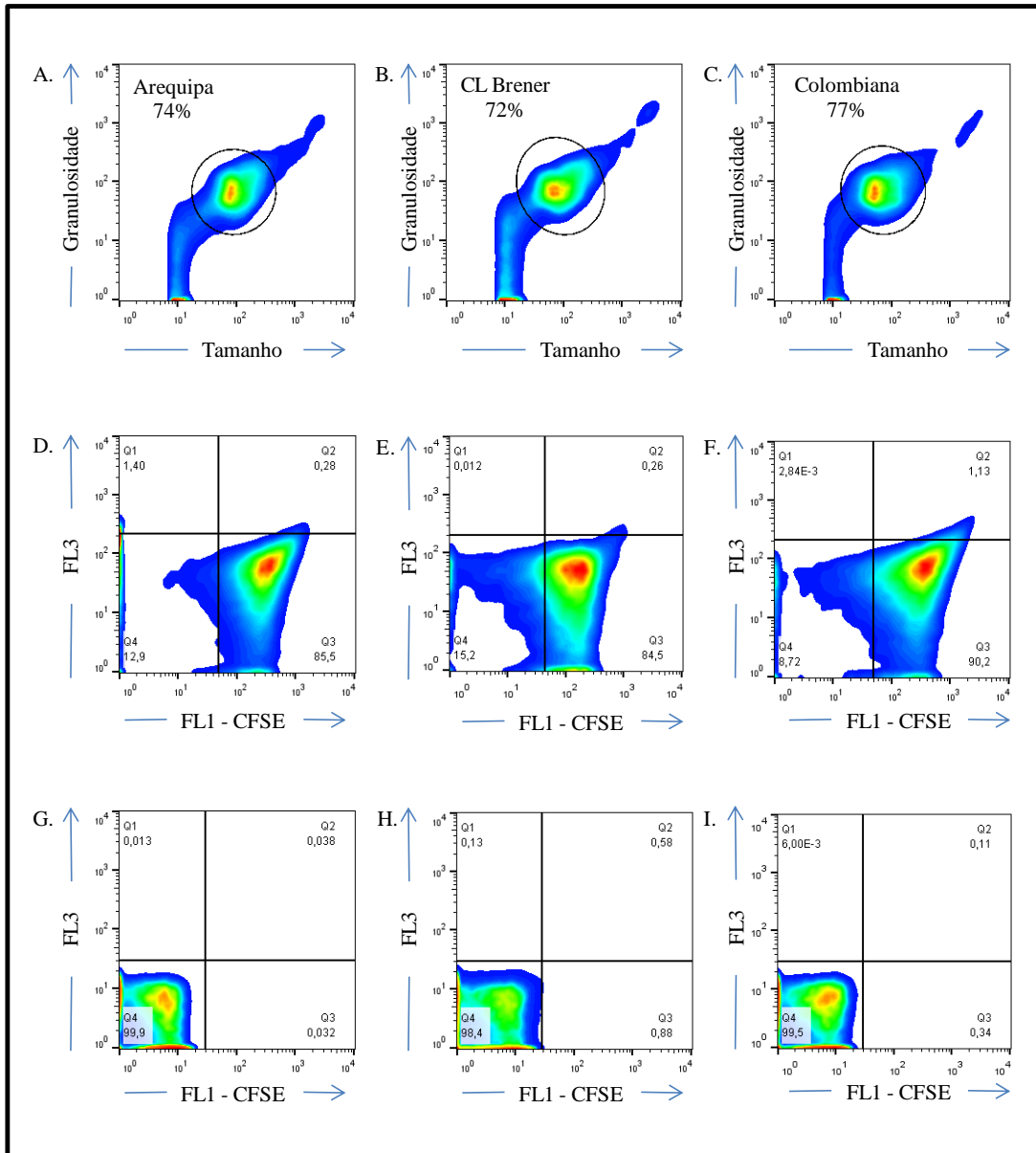


Figura 7: Marcação de tripomastigotas das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* com CFSE. Os gráficos A, B e C representam o perfil de distribuição celular de tamanho *versus* granulosidade. Os gráficos D, E e F representam a população celular de tripomastigotas não marcados. Os gráficos G, H e I, representam a população celular de tripomastigotas marcados com CFSE, selecionados na janela circular dos gráficos A, B e C. Os tripomastigotas marcados com CFSE mostram-se no Q3.

4.7 Avaliação imunofenotípica de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c após infecção com as cepas Arequipa, Colombiana e o clone CL Brener de *T. cruzi*

Macrófagos peritoneais foram obtidos como descrito no item 4.5, e colocados em tubos de cultura numa concentração de 1×10^6 células. Após disso, as células foram submetidas à imunofenotipagem a fim de avaliar a pureza desta população, assim como também para avaliar o perfil de ativação celular após a fagocitose dos tripomastigotas de *T. cruzi*. Neste sentido, foram utilizados anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo para o receptor celular de interesse, conforme descrito na Tabela 3.

Os macrófagos foram incubados com 2µl de cada anticorpo, durante 20 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. Posteriormente, foram lavados com PBS (1X) e os tubos centrifugados a 260 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas com 200 µL de PBS (1X). A leitura da marcação imunofenotípica foi realizada no citometro de fluxo (*FacScan Becton Dickinson, Mountain View, CA*) e as análises dos resultados foram geradas no software *Flowjo 10.0 (Tree Star, Ashland, OR, EUA)*.

Tabela 3: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos.

| Anticorpo anti | Fluorocromo | Clone | Fenótipo Alvo |
|----------------|--|---------|--------------------|
| F4/80 – FL3 | PerCP-(<i>Peridinin Chlorophyll</i>) | BM8 | Macrófago |
| CD80 – FL2 | PE-(<i>R-hycoerythrin</i>) | 16-10A1 | Ativação macrófago |
| MHC-II – FL1 | FITC-(<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>) | M5/114 | Ativação macrófago |
| CD19 – FL1 | FITC-(<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>) | 6D5 | Linfocito B |
| LY 6G – FL2 | APC-(<i>Allophycocyanin</i>) | RB6-8C5 | Neutrófilos |
| CD11b – FL1 | FITC-(<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>) | M1/70 | Integrina |

4.8 Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de óxido nítrico (NO) de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c após infecção com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Foi realizada a detecção de EROs utilizando o marcador fluorogênico não fluorescente 5-ou-6-carboxy-2', 7' dichlorodihydro fluorescein diacetate (carboxy-H2DCFDA, Invitrogen; 20uM) em macrófagos peritoneais infectados com tripomastogotas de *T. cruzi*. Este marcador permite a detecção de EROs intracelular por citometria de fluxo. Carboxy-H2DCFDA quando quebrado por esterases intracelulares gera a molécula carboxy-DCFH que é susceptível a reagir com as EROs não específicas tornando-se fluorescente. A produção de EROs foi inibida através do bloqueio da enzima NADPH oxidase, principal produtora de espécie reativa de oxigênio intracelular, utilizando o *Diphenyleneiodonium chloride* (DPI, 10uM) (Osaki *et al.*, 2011). A medida da fluorescência obtida foi proporcional a concentração de EROs intracelular. Da mesma forma, foi realizada a detecção de NO utilizando o marcador fluorogênico não fluorescente diacetato de 4,5-diaminofluoresceín (DAF-2DA, Calbiochem, 2mM), que permite a detecção do NO intracelular por citometria de fluxo. DAF-2DA é susceptível a reagir com NO tornando-se fluorescente. A produção do NO foi inibida através do bloqueio da enzima iNOS utilizando Aminoguanidina (AG, 10uM) (Uchida *et al.*, 2007). A medida da fluorescência obtida foi proporcional à concentração de NO intracelular (Havenga *et al.*, 2001; Strijdom e Lochner, 2004).

É importante mencionar que o DPI (10mM) e AG (10mM) foram adicionados 10 minutos antes da infecção dos macrófagos. Além disso, foi adicionado a esse desenho experimental um tubo com macrófagos estimulados com zimosan A. Brevemente, os macrófagos infectados com tripomastiotas de *T. cruzi* ou estimulados com zimosan A foram incubados durante 3 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após este tempo, a suspensão celular foi lavada com PBS (1X) e em seguida, os macrófagos foram incubados na presença dos anticorpos anti-F4/80 PerCP e anti-CD80 PE como descrito no item 4.7. Finalmente acrescentou-se 200 µL de PBS (1X) em cada tubo com a suspensão celular para leitura no citometro de fluxo (*FacScan Becton Dickinson, Mountain View, CA*), onde foram lidos 50.000 eventos dentro do *gate* de macrófagos. As análises dos resultados foram geradas no programa *Flowjo 10.0 (Tree Star, Ashland, OR, EUA)*.

4.9 Avaliação do percentual de macrófagos infectados, índice de internalização, taxas de infecção e taxas de multiplicação dos parasitos.

Para as avaliações de infecção *in vitro*, macrófagos peritoneais foram obtidos como descrito no item 4.5 e plaqueados em placas de 24 poços de fundo chato sobre lamínulas redondas de vidro de 13 mm, para microscopia (*Lab-Tek, Naperville US*), em uma concentração de 2×10^6 células/ml. Após o plaqueamento, as células foram incubadas *overnight* em estufa a 37°C e 5% CO₂, para permitir sua adesão na superfície. Posteriormente, as células foram lavadas 2 vezes com RPMI à temperatura ambiente para retirar células não aderidas, dentre elas eventuais linfócitos e hemácias. Finalmente foi adicionado novo RPMI + 10% SFB (v/v) e as células foram mantidas em estufa até o momento da infecção.

Para a infecção dos macrófagos foram utilizados tripomastigotas, numa proporção 5 parasitos/1 macrófago (5:1) (Talvani *et al.*, 2000), os quais foram incubados em meio RPMI + 10% SFB em estufa à 37°C e 5% CO₂ por 3 horas. Após esse tempo de infecção, os parasitos não interiorizados foram removidos mediante lavagem por duas vezes com RPMI a temperatura ambiente. As células aderidas foram novamente incubadas nas mesmas condições descritas acima por 24, 48 e 72 horas. Terminado cada um destes tempos após a infecção inicial, as lamínulas contendo os macrófagos foram lavadas duas vezes com PBS 1X e posteriormente as células foram fixadas com o Bouin (19 mL do estoque + 1 mL de ácido acético) por 5 minutos. Em seguida, as lamínulas foram lavadas duas vezes com H₂O destilada e finalmente os macrófagos corados com Giemsa (1mL de Giemsa + 9 mL H₂O destilada) por 30 minutos (Giannis *et al.*, 1992) para avaliação do índice de internalização, percentual de macrófagos infectados, taxa de infecção e taxa de multiplicação de *T. cruzi*.

O índice de internalização, a taxa de infecção, assim como a taxa de multiplicação de *T. cruzi* no interior de macrófagos peritoneais foram avaliados pela contagem do número de células infectadas e do número de parasitos no interior dessas células, após os diferentes tempos de infecção. A porcentagem de macrófagos infectados foi obtida a partir da contagem de 300 macrófagos em cada lamínula. Além disso, foi calculado o número de parasitos presentes no interior de 100 macrófagos (índice de internalização). A taxa de infecção (média do número de parasitos/macrófago) foi determinada avaliando o índice de internalização *versus* o número de macrófagos infectados e a taxa de multiplicação foi obtida usando a seguinte

fórmula: Taxa de multiplicação: $Tm = (F1/F0) \times (Ci0/Ci1)$ recuperado e adaptado de Kloetzel e Umezawa, 1984, onde:

F1: Índice de internalização no período final da avaliação.

F0: Índice de internalização no período inicial da avaliação.

Ci1: Células infectadas no período final da avaliação.

Ci0: Células infectadas no período inicial da avaliação.

4.10 Mapeamento de *reads* e montagem dos genes que codificam enzimas antioxidantes das cepas Arequipa e Colombiana de *T. cruzi*

Os genomas das cepas Arequipa e Colombiana de *T. cruzi* usadas neste trabalho foram sequenciados pelo método *whole genome shotgun* nas plataformas 454 e *Ion Torrent* em colaboração com a Dra. Ana Teresa Vasconcelos do Laboratório Nacional de Ciência da Computação, LNCC Petrópolis. As bibliotecas genômicas foram construídas seguindo as instruções do fabricante (Roche 454). Inicialmente o DNA genômico foi fragmentado e ligado a adaptadores específicos. Os fragmentos foram amplificados e processados na plataforma 454. As *reads* geradas foram mapeadas no genoma de referência (CL Brener haplótipo *Esmo like*) obtido da base de dados TritypBD.org., mediante o programa Bowtie2 (Langmead e Salzberg, 2012). Especificamente, neste trabalho, as *reads* mapeadas em genes anotados como: “*ascorbate-dependent peroxidase*”, “*iron superoxide dismutase*”, “*trypanothione reductase*”, “*trypanothione synthetase*” e “*tryparedoxin peroxidase*”, que codificam enzimas antioxidantes, foram recuperadas e montadas de novo usando o programa Cap3 (*Contig Assembly Program*), o qual permitiu obter os *contigs* para cada um dos genes em questão. As sequências dos *contigs* gerados foram alinhadas com as sequências dos genes antioxidantes derivados do genoma de referência (CL Brener haplótipo *Esmo like*) e montadas de novo utilizando o programa *Contig Editor* (http://genestudio.com/genestudio/contig_editor/overview). Neste sentido foram obtidas as sequências consenso para cada um dos genes antioxidantes das cepas de *T. cruzi* avaliadas neste estudo.

4.11 Desenho de *primers* para cada um dos genes antioxidantes de *T. cruzi*

Para possibilitar as posteriores análises de estimativa de número de cópias no genoma e determinar os níveis de expressão gênica por PCR em tempo real, foram desenhados os *primers* para amplificar sequências gênicas das enzimas antioxidantes. O desenho dos *primers* foi realizado com o programa Eprimer3 (<http://bioinfo.nhri.org.tw/cgi-bin/emboss/eprimer3>), utilizando as regiões das sequências gênicas conservadas, obtidas do alinhamento dos *contigs*, das cepas de *T. cruzi* avaliadas neste estudo.

4.12 Avaliação *in silico* do número de cópias dos genes antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Para determinar o número de cópias *in silico*, inicialmente foram geradas as sequências consenso dos genes antioxidantes dos genomas das cepas Arequipa e Colombiana, as quais foram previamente mapeadas no genoma da cepa de referência (CL Brener haplótipo *Esmo-like*) obtido da base de dados *Tritrypdb.org*. Deste modo, o número de cópias dos genes antioxidantes foi determinado utilizando as *reads* de 454 e *Íon Torrent* resultantes do sequenciamento genômico das cepas Arequipa e Colombiana, ambas da linhagem DTU TcI. As *reads* foram filtradas por qualidade de *Phred 20* e tamanho mínimo de read 50, utilizando o programa *Trimmomatic* (Bolger, 2014).

Estas *reads* foram mapeadas diretamente com as sequências consenso dos genes antioxidantes, utilizando o programa *BWA-mem* (Li *et al.*, 2009). O arquivo SAM resultante do mapeamento foi filtrado utilizando a ferramenta *Samtools* (Li *et al.*, 2009), onde foram gerados arquivos com *cutoffs* mínimos de qualidade de mapeamento “0”. Finalmente estes arquivos com qualidade de mapeamento “0” foram utilizados em *scripts in house* em Perl (*genecovmod.pl*), que estimam o número de cópias gênicas com base na profundidade de *reads* normalizada pela cobertura de genes de cópia simples.

4.13 Avaliação *in vitro* do número de cópias dos genes antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Para a determinação do número de cópias dos genes antioxidantes *in vitro*, foi utilizado o DNA genômico das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*. O material genético destes parasitos foi utilizado para a amplificação por PCR em tempo real e os resultados foram analisados pelo método de quantificação relativa (Ferreira *et al.*, 2006). Os ensaios foram realizados utilizando o marcador de fluorescência *SYBR Green I*, no sistema de $\Delta\Delta Ct$ comparativo no equipamento *Step One Plus Real Time 7500*, *Life Technologies*.

Neste sistema de quantificação relativa, o gene de cópia única da proteína ribossomal P2alpha da subunidade 60S do rRNA codificado por *T. cruzi* (*GenBank Acc. No. AF247063*) foi usado como controle endógeno de quantificação (gene de referência ou normalizador) para estimar o número de cópias dos genes antioxidantes (alvos). Este sistema de quantificação relativa requer a utilização de calibradores (amostras de referência), os quais são fragmentos clonados em plasmídeos (*pGEM®-T Easy* - Promega) do gene P2alpha e de cada um dos genes antioxidantes de *T. cruzi*. Neste sentido, fragmentos clonados foram utilizados como calibradores e controles da amplificação em cada teste. O software para quantificação relativa se baseia na utilização da variação do ciclo *threshold* (ΔCt) ou Ct comparativo dado pela fórmula: $N = 2^{\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = (Ct\ P2a - Ct\ alvo1) - (Ct\ P2acal - Ct\ alvo1cal)$. O Ct P2a e Ct alvo1 são valores de Ct para o gene P2 alpha e para cada um dos genes antioxidantes, respectivamente, no genoma das cepas de *T. cruzi* avaliadas neste estudo. Enquanto que o Ct P2acal e Ct alvo1cal são valores de Ct, obtidos dos calibradores contendo um número de cópias pré-estabelecidas para cada um dos fragmentos clonados (Ferreira *et al.*, 2006).

4.13.1 Clonagem dos genes antioxidantes de *T. cruzi*

O DNA genômico destes parasitos foi obtido como descrito no item 4.3 e utilizado como molde nas reações de PCR convencional para a amplificação dos genes antioxidantes. As condições de amplificação foram em um volume final de 20 μ l, contendo: Buffer 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,25 μ M de cada oligonucleótido, 0,032 U/ μ l Taq DNA polimerase (*Promega*) e 50 ng de DNA. O programa

utilizado para a amplificação consistiu em aquecimento à 94°C por cinco minutos, para desnaturação inicial do DNA, seguida por 34 ciclos de: 94°C por 1 minuto (desnaturação), 1 minuto à temperatura de anelamento, específica para cada um dos *primers* e 2 minutos à 72°C (extensão). Após os 34 ciclos, a reação foi aquecida a 72°C por dez minutos para a extensão final.

Os *amplicons* resultantes das PCRs foram submetidos à separação em gel de agarose 2% a 100 v em tampão TAE 1X (4,8g/L Tris-base pH8,0; 1,14mL ácido acético glacial; 2mL EDTA 0,5M), contendo brometo de etídio (0,3 µg/µL). Do mesmo modo, todos os produtos amplificados foram avaliados para determinar sua especificidade, utilizando o método de *Melting Curve* obtido a partir da PCR *Real time* com o fluorocromo *Syber Green I*. Este método se baseia na determinação das temperaturas de *melting* (T_m) ou temperatura de dissociação dos produtos amplificados. Após a separação em gel de agarose, as bandas de tamanho esperado foram excisadas, utilizando uma lâmina de bisturi estéril. O bloco de agarose obtido foi submetido ao protocolo do *QIAquick Gel Extraction Kit* (*Qiagen*), para obtenção do DNA purificado.

4.13.2 Ligação dos amplicons ao *pGEM-T easy*

Os *amplicons* purificados foram posteriormente clonados no vetor *pGEM-T* (*Promega*). Resumidamente, estes *amplicons* foram incubados durante 16 horas a 4°C com o vetor e a enzima T4-ligase, seguindo as instruções do fabricante (*T4 DNA Ligase - Promega*). A escolha do *pGEM-T* como vetor de clonagem, se deve a sua estrutura gênica, a qual possui uma Timina não pareada em suas extremidades 5', permitindo a ligação coesiva da Adenina não pareada adicionada pela *Taq-polimerase* na extremidade 3' do *amplicon*.

4.13.3 Transformação de bactérias por eletroporação

Para a transformação de bactérias por eletroporação, 3µL dos produtos de ligação foram incubados por 5 minutos no gelo com 50µL de bactérias *Escherichia coli*, das cepas *XLI-Blue* (*Phonutria*) eletrocompetentes. Após este período, as amostras foram transferidas para *Micro Pulser Cuvettes* (*Bio-Rad*) de 0,1 cm, e submetidas a um pulso (250kV) no eletroporador *Micro*

Pulser (Bio-Rad) permitindo a interiorização do plasmídeo. Após a eletroporação, foram adicionados 300 μ L do meio de cultura 2XYT líquido, seguido por incubação durante uma hora a 37°C com agitação em *shaker* de bancada. Após este período, as amostras foram plaqueadas em meio sólido 2XYT-ágar com 1,5% de ampicilina (100 μ g/mL). Para a seleção de transformantes positivos, o vetor *pGEM-T* possui o gene de resistência à ampicilina, o qual foi utilizado como antibiótico de seleção. As placas foram colocadas em estufa durante 12-16 horas, para obtenção de colônias isoladas. Para a identificação dos transformantes positivos, estas colônias foram submetidas à PCR, para a amplificação da região codificante do vetor *pGEM-T*, utilizando os *primers* abaixo derivados de sequências do vetor que flanqueiam o sítio de clonagem: M13 (*forward*): 5' - CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC - 3' e F13 (*reverse*): 5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC - 3'.

4.13.4 Obtenção dos padrões para a quantificação *in vitro* dos genes antioxidantes de *T. cruzi*

Os transformantes positivos das colônias previamente avaliadas por PCR foram inoculados em 3-4 mL de meio 2XYT, contendo o antibiótico de seleção, e incubados durante 12-16 horas a 37°C em agitação em *shaker* de bancada. A extração dos plasmídeos, contendo as sequências de interesse, foi realizada utilizando o *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen). Posteriormente foi avaliada a concentração e pureza do DNA plasmidial, utilizando o *NanoDrop 200c Thermo Fisher Scientific*. Finalmente, os plasmídeos obtidos foram submetidos a diluições seriadas (1:10), a partir de 10^{10} cópias, equivalente a 35 ng/ μ L, até 10^0 cópias. Os padrões de quantificação foram gerados para cada um dos genes clonados (antioxidante e endógeno) em seguida avaliados por PCR em tempo real. Os pontos de diluição dos padrões que tiveram uma eficiência e reprodutibilidade de amplificação de 100% foram usados como calibradores nos testes de quantificação relativa.

4.14 Estimativa dos níveis de expressão das enzimas antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

4.14.1 Extração de RNA total de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos BALB/c, como descrito no item 4.5 e aderidos em garrafas 75 cm² numa concentração de 4 x 10⁵ células/ml. As células foram incubadas *overnight* em estufa a 37°C e 5% CO₂ para permitir sua adesão na superfície; posteriormente lavadas 2 vezes com RPMI e infectadas com tripomastigotas das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*, numa proporção de 5 parasitos/1macrófago (5:1) (Talvani *et al.*, 2000). Após diferentes tempos de infecção (3, 24, 48 e 72 horas), os macrófagos aderidos foram lavados com PBS (1X) estéril e posteriormente tratados com 1mL de Trizol. As garrafas foram submetidas a agitação por 15 minutos em *shaker* (TS 2000A) e a solução foi posteriormente retirada e colocada em tubo *ependorf* de 1,5 ml para ser armazenada a -70°C até o momento da extração do RNA.

Para a extração do RNA total foi adicionado 0,2mL de clorofórmio para cada 1 mL de trizol recuperado, após agitação vigorosa seguido de repouso por 2-3 minutos. Depois as amostras foram centrifugadas a 12 000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foram acrescentados 0,5 mL de isopropanol 100% para cada 1 mL de trizol recuperado inicialmente, agitado gentilmente e deixado em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. A amostra foi posteriormente centrifugada a 12,000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado com etanol a 75%. Nova centrifugação foi realizada a 7500 x g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente. Após a secagem, o precipitado foi ressuscitado em 50µL de água livre de RNase. A qualidade e pureza do RNA obtido foi avaliada utilizando o *NanoDrop 2000c "Thermo Fisher Scientific"* inferidos pelas razões das leituras de absorbância a 260/280 nm e 260/230 nm, respectivamente.

4.14.2 Avaliação dos níveis de expressão das enzimas antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Para avaliar a expressão das enzimas antioxidantes de *T. cruzi* (TcAPX, TcCPX, TcMPX, TcSodA, TcSodB, TcTrR e TcTrS), foi usado o método de quantificação relativa em tempo real (*Relative qPCR Real time*). Inicialmente foi realizado um RT-PCR utilizando a enzima transcriptase reversa e o oligonucleotídeo dT para converter os mRNAs em cDNA. Para a síntese da primeira fita de cDNA foi preparado um mix nas seguintes condições: 2 µg de RNA total, 0.5 µg de oligo d(T), 1X tampão RT, 10 mM DTT, 0.5 mM dNTP, 40 U RNase e 200 U de transcriptase reversa MultiScribe™, em um volume final de 20 µl. Todos os reagentes usados foram obtidos da *Applied Biosystems* (Califórnia, US). A reação da transcrição reversa foi iniciada com incubação a 25°C por 10 min, seguido de 37°C por 120 min. e 85°C por 5 min. Após a síntese do cDNA, foi realizado um PCR em tempo real para amplificação e quantificação das sequências dos genes antioxidantes de *T. cruzi*.

As reações para o PCR em tempo real foram preparadas contendo *Master Mix SYBR Green 1X* (*Invitrogen Life Technologies*), 0,1 uM de cada iniciador e 2 µl do cDNA para completar o volume final da reação de 20 µl. As condições de amplificação foram realizadas nas seguintes etapas: 95°C por 10 min e 40 ciclos cada um a 95°C por 30 seg (desnaturação), e 60°C por 1 min (anelamento/extensão). As variações na intensidade da fluorescência se mediram no canal F1 do instrumento *StepOne Plus Real Time 7700*, no final da fase de extensão de cada ciclo. O gene constitutivo Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase de *T. cruzi* (*TcGAPDH* - XM_814806) foi usado como normalizador. A quantidade relativa dos produtos de PCR foi determinada baseada nos valores dos ciclos de *threshold* (Ct) e das eficiências de amplificação.

4.15 Infecção experimental do modelo camundongo C57BL/6 com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Para as análises de infecção *in vivo* do modelo camundongo C57BL/6, a cepa Arequipa de *T. cruzi* foi submetida a um processo de reativação (RE) através de passagem no barbeiro *Triatoma infestans* no quinto estágio ninfal (dados não mostrados). Após completar seu ciclo,

as formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Arequipa-RE obtidas no intestino dos triatomíneos adultos, foram inoculadas em camundongos C57BL6. A infecção destes animais foi verificada mediante a avaliação da parasitemia. Após a verificação da infecção, tripomastigotas sanguíneos foram obtidos e utilizados para as infecções dos grupos experimentais. No caso da cepa Colombiana e clone CL Brener, foram utilizados tripomastigotas de cultura, inoculadas em camundongos e mantidos em passagens contínuas, e após a verificação da parasitemia, os tripomastigotas sanguíneos foram utilizados para as infecções dos grupos experimentais. Previamente, a cepa Arequipa-RE também foi submetida à análise de expressão de enzimas antioxidantes, como descrito no item 4.14.

4.15.1 Inóculo de tripomastigotas sanguíneos utilizados para infecção dos camundongos C57BL/6

Para a infecção experimental foram utilizados 50 camundongos isogênicos C57BL/6 de 40 dias de idade, criados e mantidos no Biotério da Universidade Peruana Cayetano Heredia. Após a infecção, foram avaliados a cada dois dias, no laboratório de pesquisa de doenças infecciosas da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Nacional Mayor de San Marcos, seguindo às regras estabelecidas pelo Comitê de Ética no uso de Animais desta instituição com número de registro A5146-01. Os camundongos C57BL6 foram inoculados por via intraperitoneal com tripomastigotas sanguíneos provenientes de camundongos previamente infectados com *T. cruzi*. O inóculo utilizado foi de 1×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Arequipa-RE, colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*.

4.15.2 Grupos experimentais de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Os camundongos C57BL6 infectados com tripomastigotas das cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*, foram divididos em diferentes grupos experimentais, como segue: Grupo 1: 15 camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Arequipa-RE. Grupo 2: 15 camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana. Grupo 3: 15 camundongos C57BL/6 infectados com o clone CL Brener. Grupo 4: 5 camundongos

C57BL/6 não infectados utilizados como controle. Cada grupo foi subdividido em 5 subgrupos de 3 camundongos, os quais foram sacrificados em diferentes intervalos de tempo: 5, 15, 30, 60 e 120 dias após infecção inicial, conforme protocolo de Talvani *et al.*, 2000.

4.15.3 Avaliação da parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Durante a infecção experimental de todos os grupos de camundongos foi verificado a parasitemia utilizando o método de Pizzi (Pizzi, 1974), através da microscopia direta. Brevemente, foram utilizados 5 µl de sangue periférico de camundongos dos 3 grupos infectados com *T. cruzi*, sendo que o sangue foi coletado da cauda dos animais infectados e colocados entre lâmina e lamínula onde foram contados 100 campos microscópicos na objetiva de 400x, onde a média da contagem foi calculada para o acompanhamento da parasitemia a partir do terceiro dia após infecção inicial e verificado no intervalo de um dia até finalizar o tempo para cada um dos grupos de camundongos C57BL6 infectados com as cepas de *T. cruzi*, como descrito no item 4.15.2.

4.15.4 Eutanásia dos grupos experimentais de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Camundongos C57BL6 infectados com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* de acordo com o desenho experimental descrito nos itens 4.15.1 e 4.15.2., foram submetidos a eutanásia. Após o término de avaliação de cada grupo experimental infectado, os camundongos sobreviventes foram eutanasiados por exsanguinação após anestesia, utilizando como anestésico Quetamina (100mg) e Xilazina (16mg). Após a eutanásia, foram coletados o coração, colón e músculo esquelético destes camundongos destinados para a quantificação da carga parasitária (quantificação absoluta por PCR em tempo real) e análise da expressão de citocinas no tecido cardíaco (quantificação relativa por PCR em tempo real).

4.15.5 Extração de DNA do coração, colón e músculo esquelético de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener *T. cruzi*

Coração, colón e músculo esquelético (fibra estriada muscular unida ao osso, obtida da extremidade superior direita do animal) dos camundongos infectados com *T. cruzi* foram coletados e conservados em etanol a 100% para realizar a extração de DNA pelo método fenol-clorofórmio, utilizando 25 mg de tecido infectado. Brevemente, o tecido foi lavado com 600 µl de tampão TE (Tris-EDTA) e centrifugado a 21000 g por 2 min. O tecido foi submetido a trituração e em seguida foi adicionado 500 µl de Tampão de Lise TNES (10 mM Tris HCl pH 8, 200 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% SDS) com 20 µl de proteinase K numa concentração de 20mg/ml (*Invitrogen*). Posteriormente, o tecido cardíaco foi incubado a 56°C por 16 horas, após este tempo de incubação foi adicionado 750 µl de Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1), homogeneizado e centrifugado a 16000 g por 5 minutos. A fase transparente (sobrenadante) obtido após a centrifugação foi coletado e adicionado a 700 µl de Clorofórmio: Isoamílico (24:1), homogeneizado e centrifugado a 16000 g por 5 minutos. Este novo sobrenadante foi adicionado com 30 µl de acetato de sódio e 1 ml de etanol absoluto para obter o DNA. Finalmente este sobrenadante com o DNA foi centrifugado a 16 000 g por 30 minutos e o *pellet* obtido foi lavado com 1 ml de etanol a 70%, centrifugado a 16 000 g por 5 minutos e secado à temperatura ambiente. O DNA do tecido cardíaco foi ressuspendido em 100 µl de Buffer AE (Kit comercial *Qiagen*) e armazenado a -20°C até serem utilizados para as reações de PCR em tempo real.

4.15.6 Avaliação da carga parasitária tecidual do coração, colón e músculo esquelético de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener *T. cruzi*

A carga parasitária em tecidos de camundongos C57BL/6 infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* avaliadas neste estudo foi determinada mediante quantificação absoluta por PCR em tempo real. Brevemente, a PCR quantitativa em tempo real foi realizada com base em métodos previamente publicados por Piron *et al.*, (2007), com algumas modificações.

Resumidamente, o DNA foi extraído seguindo um protocolo de fenol-clorofórmio (Winkner). Os *primers* cruzi1: 5'-ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA-3' e cruzi2: 5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3' e a sonda cruzi 3: 5'-CACACACTGGACACCAA-3' marcada em 5' com FAM (6-carboxifluoresceína) e em 3' com MGB (ligante de sulco menor), foram utilizados para amplificar um fragmento de DNA de 166 pares de bases da região satélite do gDNA de *T. cruzi*. As reações para o PCR em tempo real foram preparadas contendo: 10 µL de 2X Master Mix com uracil-n-glicosilase (*Applied Biosystems*), 1 µmol / L de cada *primer*, 0,2 µmol / L da sonda cruzi 3 e 100ng do DNA genômico do tecido cardíaco, intestinal e de músculo esquelético. As condições de amplificação foram realizadas nas seguintes etapas: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de amplificação a 95°C durante 15 s, 58°C durante 1 min e 72°C durante 1 min. As variações na intensidade da fluorescência se mediram no canal F1 do instrumento *StepOne Plus Real Time 7700*, no final da fase de extensão de cada ciclo. O ciclo de *threshold* foi determinado pela curva padrão desenhado de acordo como a cepa do parasito *T. cruzi* caracterizadas previamente como DTU TcI (cepas Arequipa e Colombiana) ou DTU TcVI (clone CL Brener).

Para o desenho da curva padrão, foi inoculado 10⁵ formas epimastigotas da respectiva linhagem de *T. cruzi*, em 25 mg de tecido de camundongo não infectado (controle negativo). Em seguida foi realizada a extração de DNA pelo método fenol - clorofórmio. Uma vez obtido este DNA foi diluído sucessivamente 1:10, a partir de 10⁵ equivalente-parasito (eq.-p)/mg até 10⁰ eq.-p/mg. As diluições foram feitas com DNA de tecido não infectado numa concentração de 50 ng/µl.

4.15.7 Extração do RNA de tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener *T. cruzi* para avaliação da resposta imune celular

Tecidos cardíacos de camundongos C57BL6 foram obtidos como descrito no item 4.16.2 lavados com PBS (1X) estéril e posteriormente tratados com 1mL de Trizol. Os tecidos foram submetidos a homogeneização mecânica 1 minuto em homogeneizador de tecidos elétrico (*Kalstein*) e a solução foi posteriormente retirada e colocada em tubo *ependorf* de 1,5 ml para ser armazenada a -70°C até o momento da extração do RNA.

Para a extração do RNA total foi adicionado 0,2mL de clorofórmio para cada 1 mL de trizol recuperado, após agitação vigorosa seguido de repouso por 2-3 minutos. Depois as amostras foram centrifugadas a 12 000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foram acrescentados 0,5 mL de isopropanol 100% para cada 1 mL de trizol recuperado inicialmente, agitado gentilmente e deixado em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. A amostra foi posteriormente centrifugada a 12,000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado com etanol a 75%. Nova centrifugação foi realizada a 7500 x g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente. Após a secagem, o precipitado foi ressuscitado em 50µL de água livre de RNase. A qualidade e pureza do RNA obtido foi avaliada utilizando o *NanoDrop 2000c "Thermo Fisher Scientific"* inferidos pelas razões das leituras de absorbância a 260/280 nm e 260/230 nm, respectivamente.

4.15.8 Avaliação da expressão de citocinas no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener *T. cruzi*

Para avaliar a expressão de citocinas pró-inflamatórias (INF- γ , TNF- α e IL-12) e anti-inflamatórias (IL-10), foi usado o método de quantificação relativa em tempo real (*Relative qPCR Real time*). Inicialmente foi realizado um RT-PCR utilizando a enzima transcriptase reversa e o oligonucleotídeo dT para converter os mRNAs em cDNA. Para a síntese da primeira fita de cDNA foi preparado um mix nas seguintes condições: 2 µg de RNA total, 0.5 µg de oligo d(T), 1X tampão RT, 10 mM DTT, 0.5 mM dNTP, 40 U RNase e 200 U de transcriptase reversa MultiScribe™, em um volume final de 20 µl. Todos os reagentes usados foram obtidos da *Applied Biosystems* (Califórnia, US). A reação da transcrição reversa foi iniciada com incubação a 25°C por 10 min, seguido de 37°C por 120 min. e 85°C por 5 min. Após a síntese do cDNA, foi realizado um PCR em tempo real para amplificação e quantificação das citocinas. A sequência dos *primers* para cada uma das citocinas avaliadas neste estudo está descrita na tabela 4. As reações para o PCR em tempo real foram preparadas contendo *Master Mix SYBR Green 1X (Invitrogen life technologies)*, 0,1 uM de cada iniciador e 2 µl do cDNA para completar o volume final da reação de 20 µl. As condições de amplificação

foram realizadas nas seguintes etapas: 95°C por 10 min e 40 ciclos cada um a 95°C por 30 seg (desnaturação), e 60°C por 1 min (anelamento/extensão). As variações na intensidade da fluorescência foram medidas no canal F1 do instrumento *StepOne Plus Real Time 7700*, no final da fase de extensão de cada ciclo. O gene constitutivo β -actina de camundongos (Actb - NM_007393. 5) foi usado como normalizador. A quantidade relativa dos produtos de PCR foi determinada baseada nos valores dos ciclos de *threshold* (Ct) e das eficiências de amplificação.

Tabela 4: *Primers* para as análises da expressão gênica de citocinas no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi*

| ID | Primers | Tamanho |
|---------------|--|---------|
| B-actina | B actina-F 5'-GCTTCTTTGCA GCTCCTTCGT-3' | 68 pb |
| | B actina-R 5'-CGTCATCCATGGCGAACTG-3' | |
| IL-10 | IL-10F 5'-CATTTGAATTCCTGGGTGAGA-3' | 101 pb |
| | IL-10-R 5'-TGCTCCACTGCCTTGCTCTT-3' | |
| TNF- α | TNF- α F5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3' | 63 pb |
| | TNF- α R 5'-CCTCCACTTGGTGGTTTGCT-3' | |
| INF- γ | INF- γ F 5'-TCAGCAACAGCAAGGCGAAA-3' | 143 pb |
| | INF- γ F 5'-CCGCTTCCTGAGGCTGGAT-3' | |
| p35 IL-12 | p35 IL-12F 5'-ATCACACGGGACCAAACCA-3' | 72 pb |
| | p35 IL-12R 5'-CAGGCAACTCTCGTTCTTGTGTAGT-3' | |

4.16 Análise estatística

Os experimentos foram realizados com duas repetições em triplicatas. Neste estudo, os resultados foram avaliados pelo *Mann Whitney test* para dados não paramétricos, utilizando o programa *Graph Prism Instat3*, com intervalo de confiança a 95% ($p < 0.05$). Para avaliar os dados de interação também foi utilizado o teste de correlação não paramétrica de *Spearman* (r^2).

5 RESULTADOS

Neste trabalho, para melhor compreensão, os resultados serão apresentados em dois tópicos. No primeiro tópico, serão mostrados os resultados das análises *in vitro* da interação das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* com macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, além de características intrínsecas no genoma de cada uma destas cepas. No segundo tópico, serão mostrados os resultados do parasitismo tecidual, bem como a expressão de citocinas no tecido cardíaco, após infecção experimental *in vivo* de camundongos C57BL/6 com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*.

5.1 TÓPICO I:

5.1.1 Análise genotípica da cepa Arequipa e diferentes isolados de *T. cruzi*

A caracterização genotípica do isolado de *T. cruzi*, proveniente da localidade de “La Joya”, região situada ao Oeste da cidade de Arequipa, foi determinada por meio da análise combinada do polimorfismo de diferentes alvos moleculares conforme descrito no item 4.3. Na sequência serão descritos os resultados obtidos para cada um desses marcadores.

5.1.1.1 Amplificação do gene citocromo oxidase II (COII) da cepa Arequipa e diferentes isolados de *T. cruzi*

Produtos amplificados do gene COII (375 pb) das cepas Arequipa, Y, CH23, ERA, Bug 2148, Colombiana, Viera e clone CL Brener (Fig. 8), foram submetidos a digestão enzimática com *AluI*, o que permitiu a sua classificação nos diferentes haplótipos ou linhagens de *T. cruzi*. Desta forma, a cepa Arequipa apresentou o perfil de bandas duplas de 81pb e 264pb, semelhante à cepa Colombiana, sendo representativo do haplótipo A ou da linhagem DTU I; a cepa Y apresentou o perfil de bandas de 81, 82 e 212 pb semelhante com as cepas CH23 e Viera, sendo representativos do haplótipo C ou da linhagem DTU II. Por outro lado, o clone CL Brener e as cepas ERA e Bug 2148 apresentaram o perfil duplo de 81 e 294 pb o qual corresponde ao haplotipo B ou às linhagens DTU IV/V ou VI (Fig. 9).

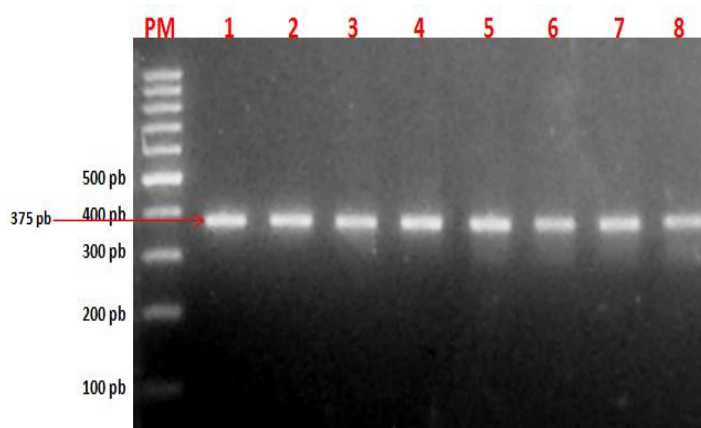


Figura 8: Amplificação do gene citocromo oxidase II (COII): Genotipagem dos isolados de *Trypanosoma cruzi* provenientes de Bolívia - Viera (1), da região de Arequipa - Peru (2), de Colômbia - Colombiana (3), de Venezuela - ERA (4), do sul de Brasil - Bug 2148 (5) e CL Brener (6), de São Paulo - Y (7) e de Paraguai - CH23 (8). No gel é observado uma banda de 375 pb correspondente ao gene não digerido pela enzima de restrição. PM: Padrão peso molecular (100 pb).

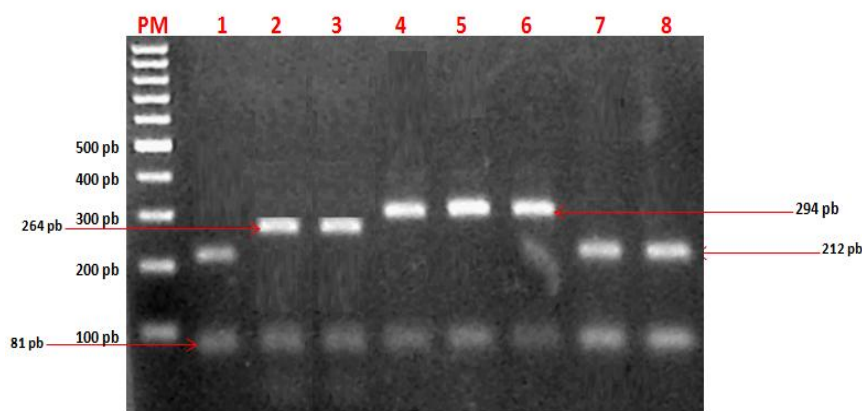


Figura 9: Digestão enzimática com *Alu I* do gene *COII*: Genotipagem dos isolados de *Trypanosoma cruzi* provenientes de Bolívia - Viera (1), da região de Arequipa - Peru (2), de Colômbia - Colombiana (3), de Venezuela - ERA (4), do sul de Brasil - Bug 2148 (5) e CL Brener (6), de São Paulo - Y (7) e de Paraguai - CH23 (8). No gel é observado perfis característicos do haplotipo A ou da linhagem DTU I (264 e 81 pb), do haplotipo C ou da linhagem DTU II (212, 82 e 81 pb) e do haplotipo C ou da linhagem DTU IV/V ou VI (294 e 81 pb). PM: Padrão peso molecular (100 pb).

5.1.1.2 Amplificação do espaçador intergênico do gene mini-exon (SL - IRac) da cepa Arequipa e diferentes isolados de *T. cruzi*

As cepas e clone de *T. cruzi*, foram também submetidas à amplificação do fragmento de DNA do espaçador intergênico do miniexon (SL-IR) de *T. cruzi*. Os resultados mostraram que a maioria das cepas tem um perfil de banda de 150 pb, representativo das linhagens DTU I, II, V e VI. Por outro lado, a cepa ERA foi a única que apresentou um perfil de banda de 200 pb, representativo da linhagem DTU III ou IV, (Fig. 10).

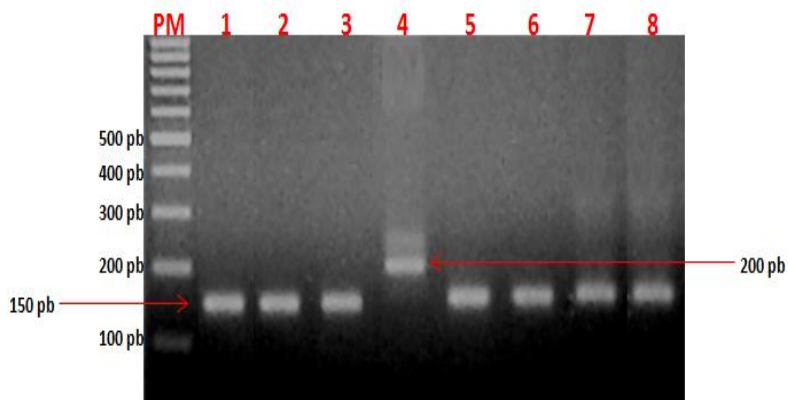


Figura 10: Amplificação do gene do espaçador intergênico do miniexon (SL-IR): Genotipagem dos isolados de *Trypanosoma cruzi* provenientes de Bolívia - Viera (1), da região de Arequipa - Peru (2), de Colômbia - Colombiana (3), de Venezuela - ERA (4), do sul de Brasil - Bug 2148 (5) e CL Brener (6), de São Paulo - Y (7) e de Paraguai - CH23 (8). No gel é observado uma banda de 200 pb representativo da linhagem DTU IV; também observa-se bandas de 150 pb, representativo das linhagens DTU I, II, V ou VI. PM: Padrão peso molecular (100 pb).

5.1.1.3 Amplificação do gene rDNA 24S α (LSUrDNA) da cepa Arequipa e diferentes isolados de *T. cruzi*

Finalmente as cepas e clone de *T. cruzi*, foram submetidas à avaliação do polimorfismo do gene rDNA 24S α (LSUrDNA) e a amplificação deste gene mostrou que as cepas Viera, CH23, Y e clone CL Brener apresentaram um perfil de banda de 125 pb, correspondente com a linhagem DTU II ou VI; desta forma as cepas Viera, CH23 e Y foram confirmadas como da linhagem DTU II e o clone CL Brener como da linhagem DTU VI. Por outro lado, as cepas Arequipa, Colombiana e Bug 2148 apresentaram um perfil de banda de 110 pb, correspondente com as linhagens DTU I ou V; desta forma as cepas Arequipa e Colombiana foram confirmadas como da linhagem DTU I e a cepa Bug 2148 como da linhagem DTU V. No entanto, a cepa ERA apresentou um perfil de banda de 120 pb, sendo confirmada pertencente à linhagem DTU IV (Fig. 11).

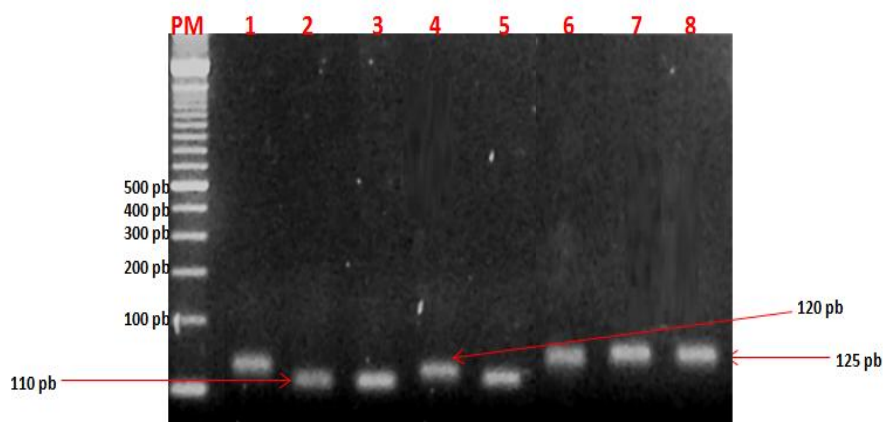


Figura 11: Amplificação do gene rDNA 24S α (LSUrDNA): Genotipagem dos isolados de *Trypanosoma cruzi* provenientes de Bolívia - Viera (1), da região de Arequipa - Peru (2), de Colômbia - Colombiana (3), de Venezuela - ERA (4), do sul de Brasil - Bug 2148 (5) e CL Brener (6), de São Paulo - Y (7) e de Paraguai - CH23 (8). No gel é observado bandas de 110 pb correspondentes às linhagens DTU I ou V, banda de 120 pb correspondente com a linhagem DTU IV e bandas de 125 pb correspondentes a linhagem DTU II ou VI. PM: Padrão peso molecular (100 pb).

5.1.2 Caracterização da capacidade infectante das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Os estudos de interação do parasito com as células hospedeiras iniciaram-se com a caracterização imunofenotípica das células coletadas do peritônio de camundongos BALB/c. Posteriormente, para determinar a capacidade infectante ou invasiva, macrófagos obtidos do peritônio de camundongos BALB/c foram infectados com tripomastigotas das cepas Arequipa,

Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* e avaliados 3 horas após a infecção inicial e nos tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação (Fig. 12). Neste sentido, foram avaliados o percentual de fagocitose, o índice de internalização, o percentual de macrófagos infectados (PMI), a taxa de infecção (TI) e a taxa de multiplicação (TM) de *T. cruzi* no interior dos macrófagos peritoneais. Os resultados foram apresentados como a média da porcentagem de triplicatas \pm desvio padrão da média.

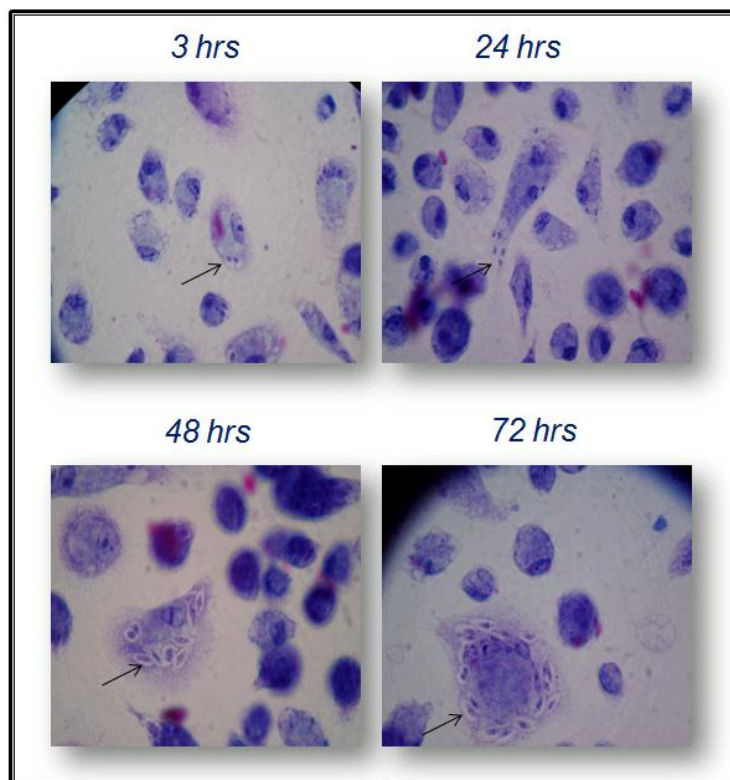


Figura 12: Imagens representativas da infecção de macrófagos do peritônio de camundongos BALB/c, com a cepa Arequipa de *T. cruzi*, nos tempos de 3, 24, 48 e 72 horas após a infecção inicial. O método para a visualização e contagem dos parasitos foi *Giemsa-Bouin*. As setas mostram amastigotas no interior de macrófagos. Microscópio de Luz a objetiva de 100X

5.1.2.1 Caracterização imunofenotípica de células coletadas do peritônio de camundongos BALB/c

Células coletadas do peritônio de camundongos BALB/c foram submetidos a um estudo de caracterização imunofenotípica e os resultados foram obtidos através do método de citometria de fluxo. A figura 13A representa o perfil de dispersão celular de tamanho *versus* granulosidade da população celular obtida após lavagem do peritônio de camundongos

BALB/c. A figura. 13B representa a fluorescência pontual para seleção da população de macrófagos peritoneais no *gate* R1, através da combinação de anticorpos anti-F4/80-PerCP e antiCD80-PE, onde o percentual de macrófagos foi de 91,1%. A figura 13C representa a fluorescência pontual para seleção da população de neutrófilos no *gate* R2, através da combinação de anticorpos anti-Ly6G-APC e anti-CD11b-FITC, com o intuito de constatar a ausência de neutrófilos na população de células coletadas do peritônio, onde o percentual de neutrófilos foi de 1,13%. Finalmente, a figura 13D representa a de fluorescência pontual para seleção da população de linfócitos B presentes no lavado peritoneal, no *gate* R3, através da combinação de anticorpos anti- F4/80-PerCP e antiCD19-FITC, onde o percentual de linfócitos B foi de 4,45%. É importante salientar que o gráfico de fluorescência pontual para seleção da população de macrófagos peritoneais, corresponde também ao *gate* R4.

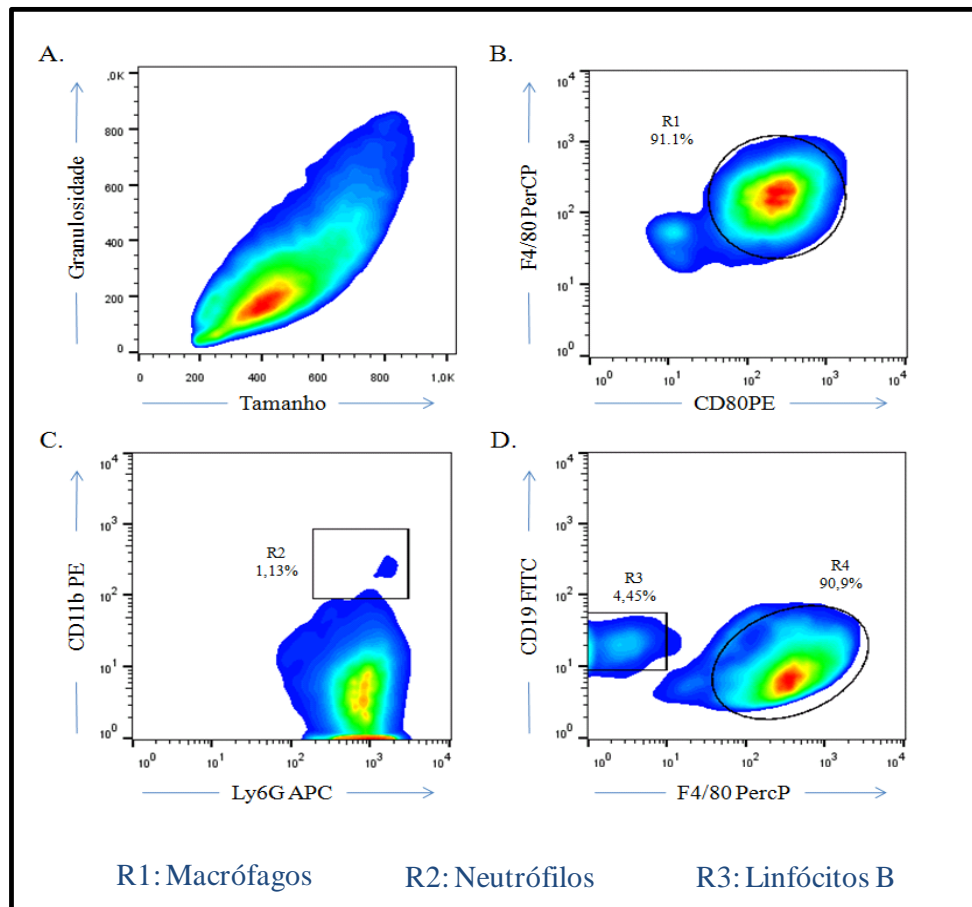


Figura 13: Caracterização imunofenotípica de células coletadas do peritônio de camundongos BALB/c. A) Representação do perfil celular em gráfico de tamanho *versus* granulosidade. B) Perfil de distribuição celular em gráfico de fluorescência FL3 – F4/80 PercP *versus* fluorescência FL2 – CD80PE. C) Perfil de distribuição celular em gráfico de fluorescência FL2 – Ly6G APC *versus* fluorescência FL1 – CD11b FITC. D) Perfil de distribuição celular em gráfico de fluorescência FL3 – F4/80 PercP *versus* fluorescência FL1 – CD19 FITC.

5.1.2.2 Avaliação do percentual de fagocitose das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Neste estudo, foi avaliada a capacidade fagocítica dos macrófagos isolados do peritônio de camundongos BALB/c através da citometria de fluxo. Macrófagos peritoneais foram incubados com o zimosan A ou infectados com tripomastigotas das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*. Macrófagos não infectados foram utilizados como controle da fagocitose. Inicialmente, os macrófagos peritoneais foram selecionados por suas características morfométricas e imunofenotípicas, através de gráficos de distribuição pontual de FL3 - F4/80 PerCP *versus* FL2 – CD80 PE (Fig. 14A). Após a seleção da região de interesse (R1), a mesma foi avaliada para verificar a capacidade fagocítica dos macrófagos, através da construção de gráficos FL3 - F4/80 PerCP *versus* FL1 – CFSE (Fig. 14B) para determinação do percentual de fagocitose foi no quadrante 2 (Q2).

Os resultados mostraram que 3 horas após a infecção inicial, não houve diferenças estatísticas significativas na fagocitose das cepas Arequipa ($44,03 \pm 3,012\%$), Colombiana ($48,08 \pm 3,06\%$) e clone CL Brener ($46,35 \pm 4,14\%$). Por outro lado, observou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) na fagocitose de zimosan A ($64,75 \pm 3,48\%$), quando comparada com a fagocitose das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* e também quando comparada com o controle não infectado ($1,47 \pm 0,21\%$) (Fig. 14C).

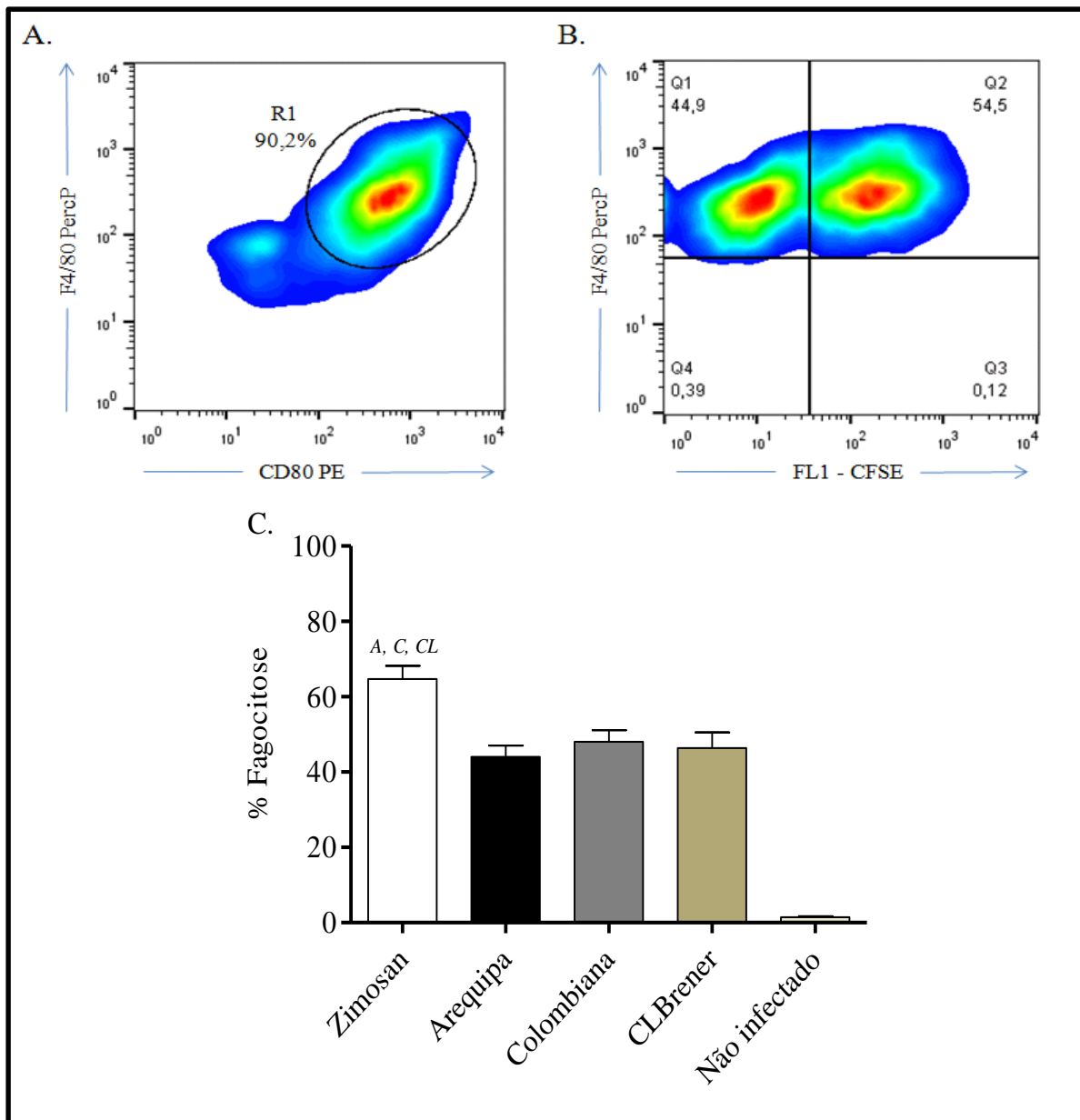


Figura 14: Avaliação do percentual de fagocitose, por macrófagos do peritônio de camundongos BALB/c incubados com o zimosan A ou infectados com tripomastigotas das cepas Arequipa, Colombiana e do clone CL Brener de *T. cruzi*, previamente marcados com CFSE. **A)** Seleção da população de macrófagos na presença de zimosan A, pelo perfil de distribuição celular, FL3 - F4/80 PerCP versus FL2 - CD80 PE. **B)** Percentual da fagocitose obtido a partir do quadrante 2 (Q2), pelo perfil de distribuição celular, FL3 - F4/80 PerCP versus FL1 - CFSE da população selecionada na janela R1 do gráfico A. **C)** Avaliação da fagocitose das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* ou na presença de zimosan A, 3 horas após a infecção inicial. **A:** representa diferença significativa ($p < 0,05$) da fagocitose em relação à cepa Arequipa. **C:** representa uma diferença significativa ($p < 0,05$) da fagocitose em relação à cepa Colombiana. **CL:** representa uma diferença significativa ($p < 0,05$) da fagocitose em relação ao clone CL Brener.

5.1.2.3 Avaliação do índice de internalização e percentual de macrófagos infectados pelas cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Neste estudo foi avaliado o índice de internalização (Ii) das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener em macrófagos do peritônio de camundongos BALB/c. O índice de internalização é equivalente ao número médio de amastigotas/100 macrófagos. Os resultados mostraram que 3 horas após a infecção inicial não houve diferenças estatísticas significativas no Ii entre as cepas: Arequipa ($55 \pm 6,4$), Colombiana ($58,0 \pm 0,8$) e clone CL Brener ($55,3 \pm 3,3$). Esta mesma análise foi feita 24, 48 e 72 horas após a infecção inicial e os resultados mostraram que 24 horas após a infecção inicial, houve uma diferença significativa ($p < 0.05$) no Ii durante a infecção com a cepa Colombiana ($119,6 \pm 6,6$), quando comparada com a cepa Arequipa ($72,6 \pm 7,1$) e clone CL Brener ($73,6 \pm 1,5$). Do mesmo modo, observou-se que 48 e 72 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0.05$) no Ii durante a infecção com a cepa Colombiana ($239,3 \pm 38,1$ e $452,0 \pm 28,6$, respectivamente) e clone CL Brener ($288,8 \pm 14,5$ e $553,6 \pm 25,6$, respectivamente), quando foram comparados com a cepa Arequipa ($138,6 \pm 32,7$ e $303,3 \pm 28,5$, respectivamente); assim também, 72 horas após a infecção inicial, houve uma diferença significativa ($p < 0.05$) no Ii durante a infecção com o clone CL Brener, quando foi comparado com a cepa Colombiana (Fig. 15A).

Neste estudo também foi avaliado o percentual de macrófagos infectados (PMI) nos diferentes tempos após infecção inicial. Os resultados mostraram que 3 horas após a infecção inicial houve uma diferença significativa ($p < 0.05$) no PMI durante a infecção com a cepa Colombiana ($40,5 \pm 1,2$), quando foi comparada com a cepa Arequipa ($34,1 \pm 1,4$) e clone CL Brener ($31,0 \pm 2,3$). Do mesmo modo, observou-se que 24, 48 e 72 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0.05$) no PMI durante a infecção com a cepa Arequipa ($41,7 \pm 3,5\%$; $48,7 \pm 3,5\%$ e $51,7 \pm 1,2\%$, respectivamente) e Colombiana ($47,8 \pm 1,9\%$; $53,3 \pm 1,2\%$ e $63,0 \pm 2,1\%$, respectivamente), quando foram comparadas com o clone CL Brener ($36,5 \pm 1,3\%$; $41,8 \pm 1,4\%$ e $45,7 \pm 3,3\%$, respectivamente); assim também, 72 horas após a infecção inicial, houve uma diferença significativa ($p < 0.05$) no PMI durante a infecção com a cepa Colombiana, quando foi comparada com a cepa Arequipa (Fig. 15B).

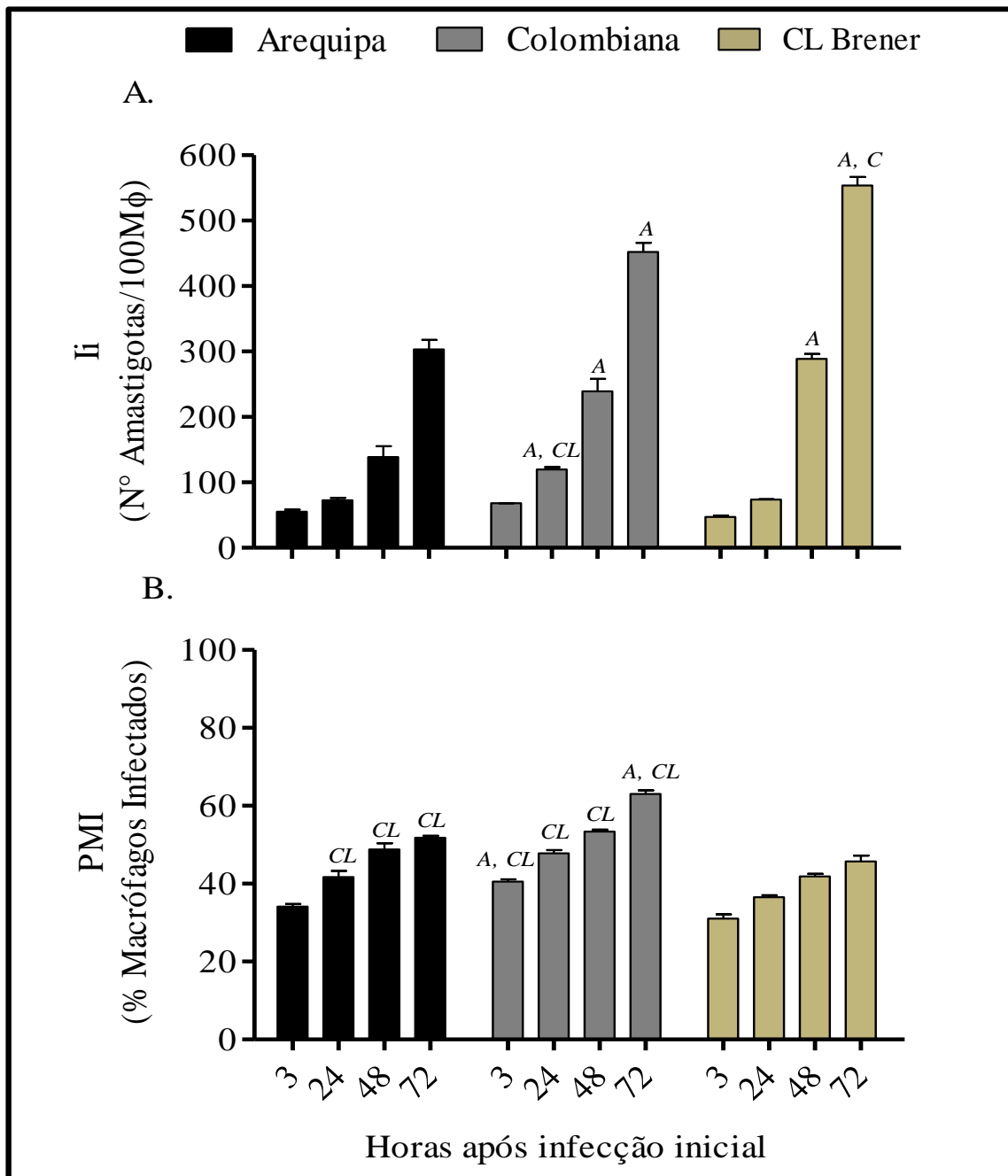


Figura 15: Avaliação da capacidade infectante das cepas Arequipa, Colombiana e do clone CL Brener de *T. cruzi*, em macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c, nos tempos de 3, 24, 48 e 72 horas após a infecção inicial. **A)** Índice de Internalização (Ii). A linha conectora representa diferença significativa ($p < 0.05$) do Ii entre as cepas de *T. cruzi*. **B)** Percentual de macrófagos infectados (PMI). A: representa diferença significativa ($p < 0.05$) do Ii e PMI em relação à cepa Arequipa. C: representa uma diferença significativa ($p < 0,05$) do Ii e PMI em relação à cepa Colombiana. CL: representa uma diferença significativa ($p < 0,05$) do Ii e PMI em relação ao clone CL Brener.

Com a finalidade de verificar a concordância entre o aumento do número de parasitos (amastigotas) no interior de macrófagos, nos diferentes tempos após infecção inicial, com o número destas células infectadas, foram realizadas análises de correlação. Os resultados mostraram uma correlação significativa ($p < 0,0001$) entre o Ii e o PMI pelas cepas Arequipa ($r^2 = 0,5993$) (Fig. 16A), Colombiana ($r^2 = 0,9089$) (Fig. 16B) e clone CL Brener ($r^2 = 0,8394$) (Fig. 16C). Estes resultados significam que houve um aumento do Ii que foi diretamente proporcional com o número de macrófagos infectados.

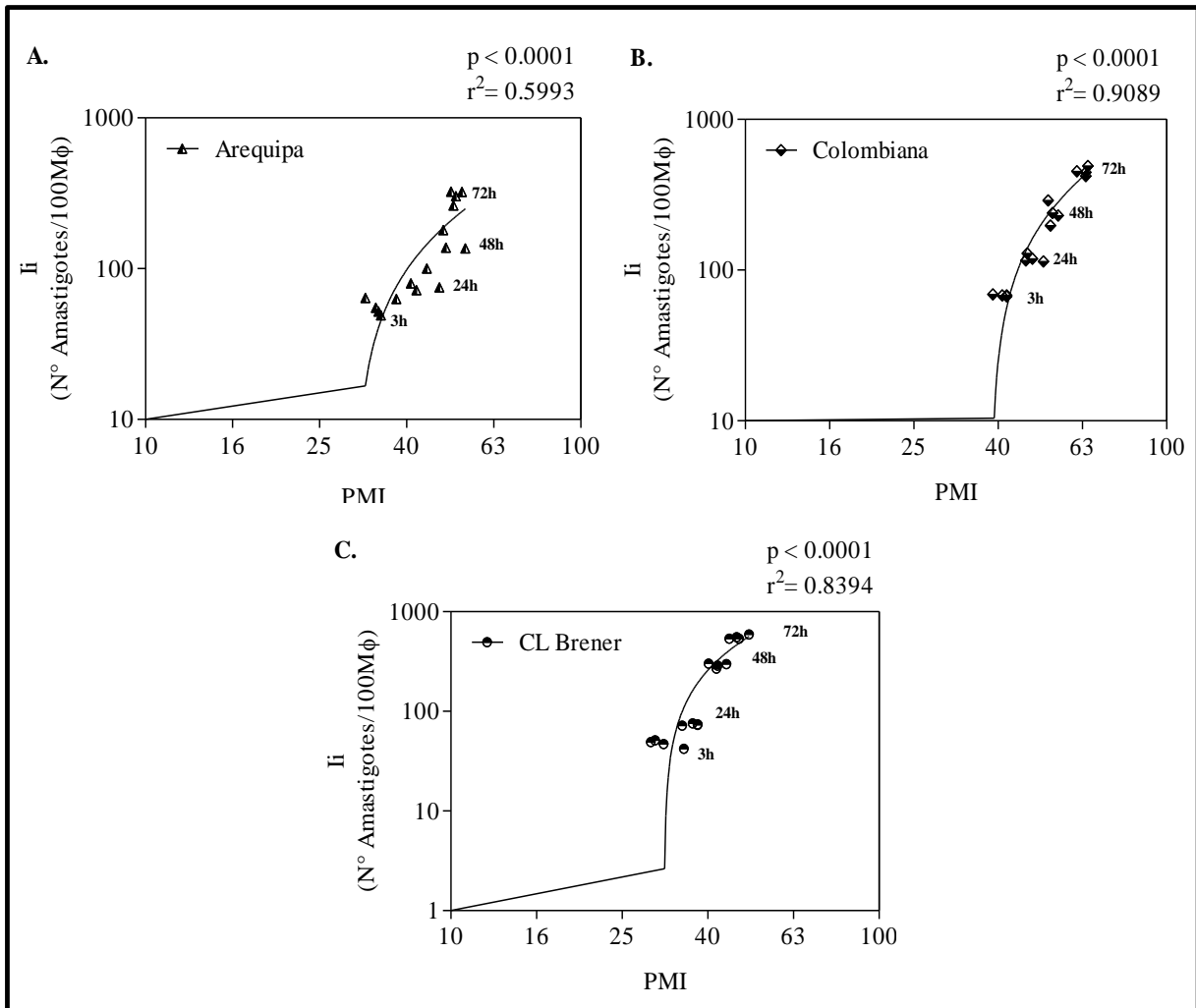


Figura 16: Correlação entre o índice de internalização (Ii) e o percentual de macrófagos infectados (PMI) com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* nos tempos de 3, 24, 48 e 72 horas após a infecção inicial. A) Correlação do Ii vs PMI pela da cepa Arequipa B) Correlação do Ii vs PMI pela da cepa Colombiana C) Correlação do Ii vs PMI pelo clone CL Brener. O valor de correlação significativa (p value), os coeficientes de Spearman (r) e as curvas de regressão linear estão representados nos gráficos.

5.1.2.4 Avaliação das taxas de infecção e multiplicação das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Com base nos resultados anteriores, avaliou-se a taxa de infecção (TI) e a taxa de multiplicação (TM). TI representa o número médio de amastigotas/macrófago. Os resultados mostraram que 3 horas após a infecção inicial não houve diferenças estatísticas significativas na TI entre as cepas: Arequipa ($1,6 \pm 0,1$), Colombiana ($1,6 \pm 0,04$) e clone CL Brener ($1,5 \pm 0,1$). Esta mesma análise foi feita 24, 48 e 72 horas após a infecção inicial e os resultados mostraram que 24 horas após a infecção inicial, houve uma diferença significativa ($p < 0.05$) na TI durante a infecção com a cepa Colombiana ($2,5 \pm 0,1$), quando foi comparada com a cepa Arequipa ($1,7 \pm 0,08$) e clone CL Brener ($2,0 \pm 0,03$). Do mesmo modo, observou-se que 48 e 72 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0.05$) na TI durante a infecção com o clone CL Brener ($6,9 \pm 0,2$ e $11,8 \pm 0,1$; respectivamente), quando foi comparado com as cepas Arequipa ($2,8 \pm 0,3$ e $5,9 \pm 0,2$; respectivamente) e Colombiana ($4,5 \pm 0,3$ e $7,4 \pm 0,5$; respectivamente); assim também, 48 e 72 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0.05$) na TI durante a infecção com a cepa Colombiana, quando foi comparado com a cepa Arequipa (Fig. 17A).

Neste estudo também foram comparadas as taxas de multiplicação (TM) das formas amastigotas de *T. cruzi*, em diferentes intervalos de tempo após a infecção inicial (3-24 horas, 3-48 horas e 3-72 horas). Os resultados mostraram que no intervalo de 3-24 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0.05$) na TM durante a infecção com a cepa Colombiana ($1,4 \pm 0,08$) e clone CL Brener ($1,4 \pm 0,1$), quando foram comparados com a cepa Arequipa ($1,07 \pm 0,2$). Do mesmo modo, observou-se que nos intervalos de 3-48 horas e de 3-72 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0.05$) na TM durante a infecção com o clone CL Brener ($4,6 \pm 1,1$ e $7,9 \pm 1,4$; respectivamente), quando foi comparado com as cepas Arequipa ($1,7 \pm 0,5$ e $3,6 \pm 0,5$, respectivamente) e Colombiana ($2,6 \pm 0,5$ e $4,4 \pm 0,7$, respectivamente) (Fig. 17B).

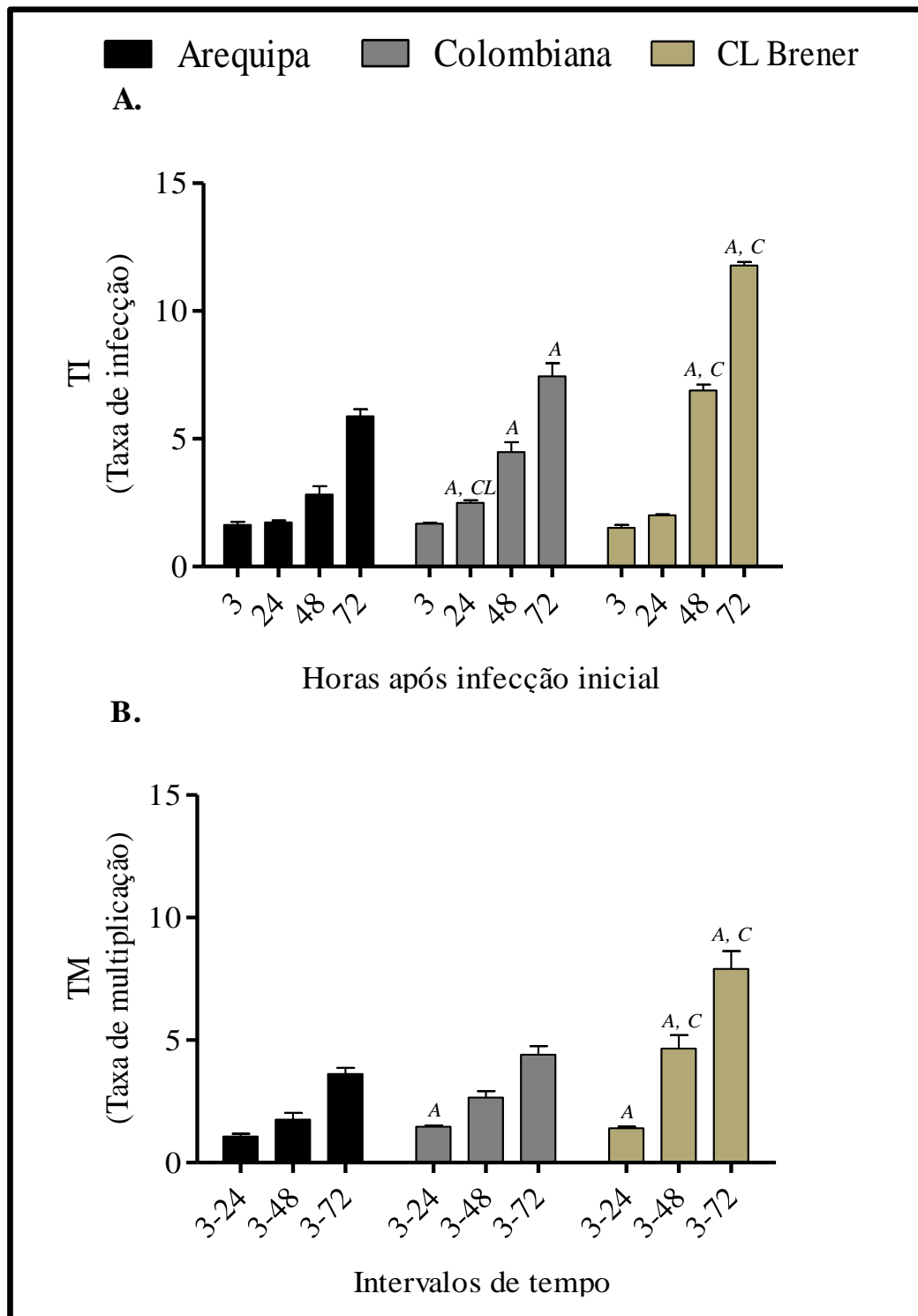


Figura 17: Avaliação da capacidade infectante e replicativa das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* em macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c; nos tempos de 3, 24, 48 e 72 horas e nos intervalos de 3-24, 3-48 e 3-72 horas, após a infecção inicial. **A. Taxa de infecção (TI):** Avaliação do número de amastigotas/Mφ. **B. Taxa de multiplicação (TM):** Avaliação da capacidade multiplicativa dos amastigotas. A: representa diferença significativa ($p < 0.05$) da TI e TM em relação à cepa Arequipa. C: representa uma diferença significativa ($p < 0.05$) da TI e TM em relação à cepa Colombiana. CL: representa uma diferença significativa ($p < 0.05$) da TI e TM em relação ao clone CL Brener.

5.1.3 Caracterização do perfil de ativação de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* pela presença de moléculas de superfície (MHC-II e CD80) e através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO).

5.1.3.1 Avaliação da presença de moléculas de superfície (MHC-II e CD80) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, após internalização das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

As análises de moléculas de superfície MHCII (I-A) e CD80, foram realizadas para determinar a ativação de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c, após a internalização de tripomastigotas das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* marcadas ou não com CFSE.

Os resultados mostraram aumento do percentual da molécula do complexo maior de histocompatibilidade II (MHC-II) nos macrófagos incubados com zimosan A (controle positivo da internalização), bem como nos macrófagos infectados com tripomastigotas de *T. cruzi*. Inicialmente os macrófagos foram selecionados por suas características morfométricas e imunofenotípicas, através de gráficos de distribuição pontual de FL3 - F4/80 PerCP *versus* FL2 – CD80 PE (Fig. 18A) e após a seleção da região de interesse (R1) foi avaliado a presença da molécula MHC-II, através da construção de gráficos FL3 - F4/80 PerCP *versus* FL1 – MHC-II. O percentual do MHC-II nos macrófagos peritoneais infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* ou na presença de zimosan A foi verificado no quadrante 2 (Q2). É importante salientar que os macrófagos peritoneais foram estimulados com 3% de tioglicolato, 3 dias antes de ser isolados, neste sentido o percentual do MHC-II foi de 12,6% nos macrófagos peritoneais não infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* ou na presença de zimosan A (Fig. 18B). Por outro lado, observou-se um percentual do MHC-II de 99,0% para o estímulo de macrófagos na presença do zimosan A (Fig. 18C), assim como um percentual do MHC-II de 96,2%; 98,2% e 96,7%, correspondente a macrófagos infectados com as cepas Arequipa (Fig. 18D), Colombiana (Fig. 18E) e clone CL Brener (Fig. 18F), respectivamente.

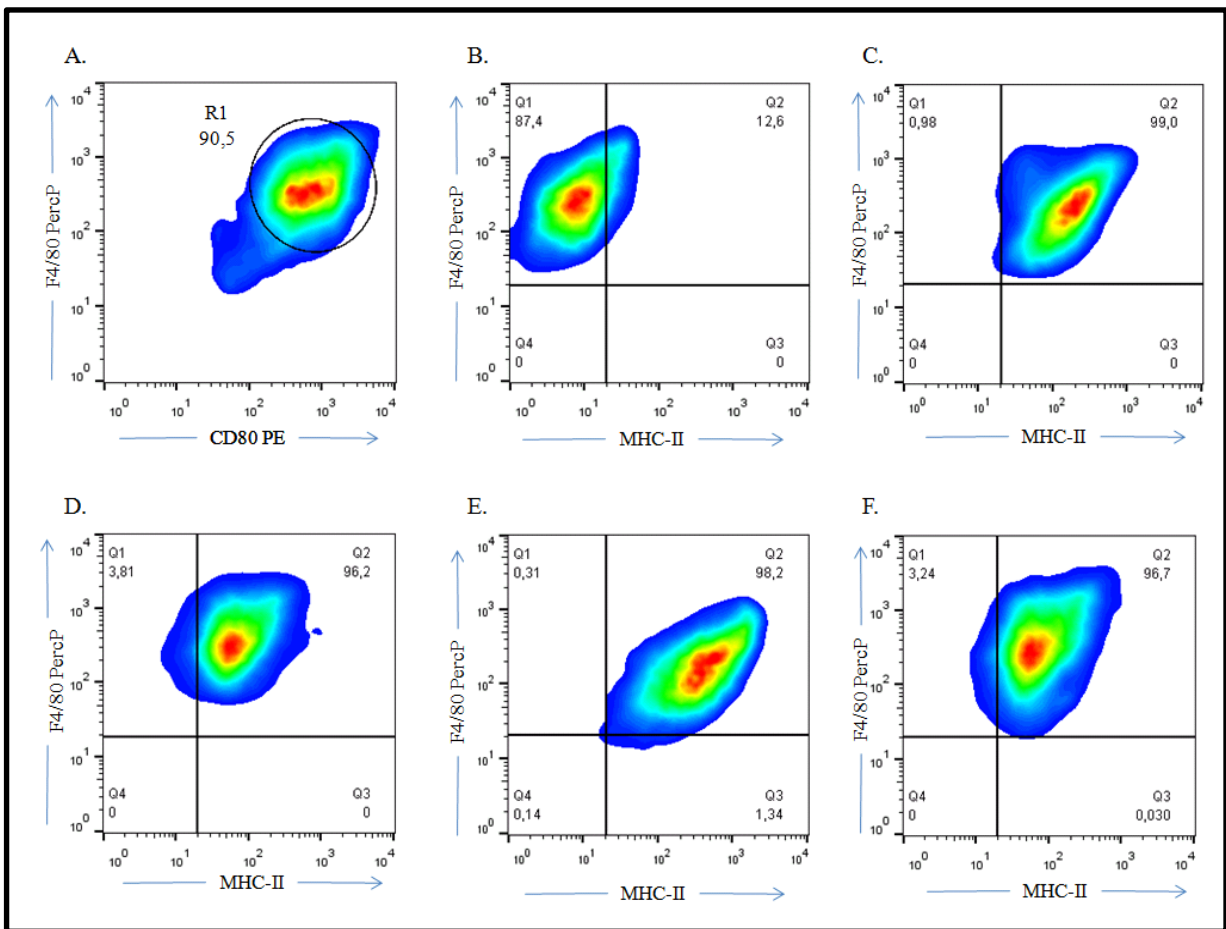


Figura 18: Avaliação da molécula do complexo maior de histocompatibilidade II (MHC-II), em macrófagos infectados com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*. **A)** Seleção imunofenotípica da população de macrófagos peritoneais obtidas de camundongos BALB/c. **B)** Percentual do MHC-II em macrófagos não infectados. **C)** Percentual do MHC-II em macrófagos na presença de zimosan A. **D)** Percentual do MHC-II em macrófagos infectados com a cepa Arequipa. **E)** Percentual do MHC-II em macrófagos infectados com a cepa Colombiana e **F)** Percentual do MHC-II em macrófagos infectados com o clone CL Brener. O percentual do MHC-II em macrófagos peritoneais está representado no Q2.

Os resultados da análise estatística mostraram que 3 horas após a infecção inicial, não houve diferenças significativas na expressão do MHC-II entre as cepas Arequipa ($93,8 \pm 2,6\%$), Colombiana ($90,8 \pm 2,9\%$) e clone CL Brener ($91,2 \pm 2,0\%$), assim como na presença do zimosan A ($94,8 \pm 1,8\%$). No entanto, observou-se diferenças significativas ($p < 0.05$) na expressão do MHC-II entre os macrófagos infectados ou na presença de zimosan A, quando foram comparados com o controle de macrófagos não infectados ($11,8 \pm 1,5\%$) (Fig. 19).

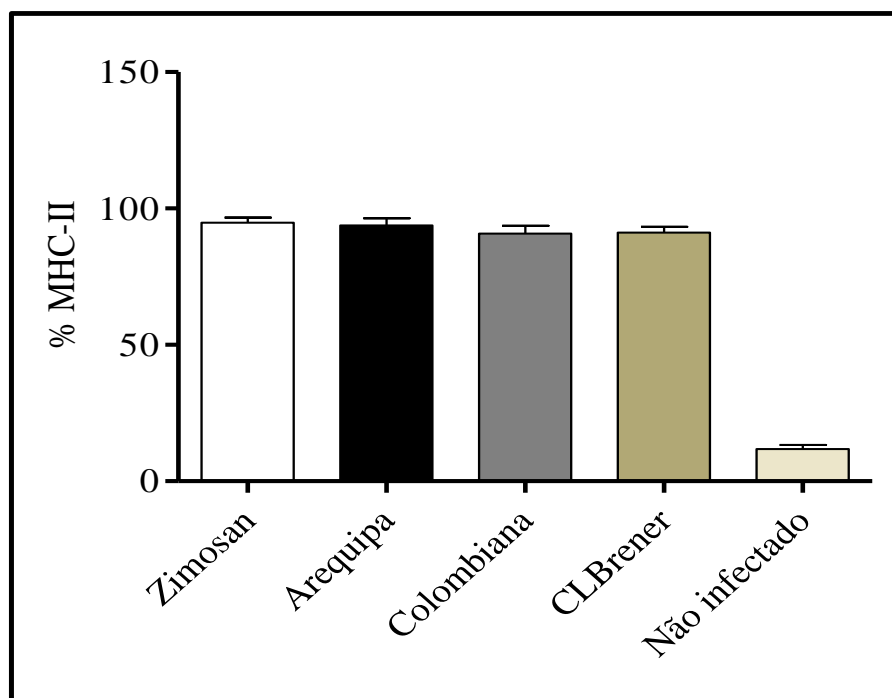


Figura 19: Percentual do complexo maior de histocompatibilidade-II (MHC-II) em macrófagos infectados com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* ou na presença de zimosan A. Houve diferenças significativas ($p < 0.05$) em relação ao grupo de macrófagos não infectados.

Além do MHCII, a molécula CD80 que atua auxiliando na apresentação de antígenos, foi avaliada para demonstrar o perfil de ativação de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c. Inicialmente, as células do conteúdo peritoneal foram representadas através do perfil de dispersão celular, de tamanho *versus* granulosidade (Fig. 20A). Posteriormente foi avaliada a presença da molécula CD80 em macrófagos peritoneais através da construção de gráficos FL3 - F4/80 PerCP *versus* FL2 – CD80 PE.

O percentual de CD80 nos macrófagos peritoneais infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* ou na presença de zimosan A, foi verificada no quadrante 6 (Q6). É importante salientar que os macrófagos peritoneais foram estimulados com 3% de tioglicolato, 3 dias antes de ser isolados, neste sentido o percentual do CD80 foi de 19,3% nos macrófagos peritoneais não infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* ou na presença de zimosan A (Fig. 20B). Por outro lado, observou-se um percentual do CD80 de 100,0% para o estímulo de macrófagos na presença do zimosan A (Fig. 20C), assim como um percentual do CD80 de 100,0%; 98,9%; e 99,6%, correspondente a macrófagos infectados com as cepas Arequipa (Fig. 20D), Colombiana (Fig. 20E) e clone CL Brener (Fig. 20F), respectivamente.

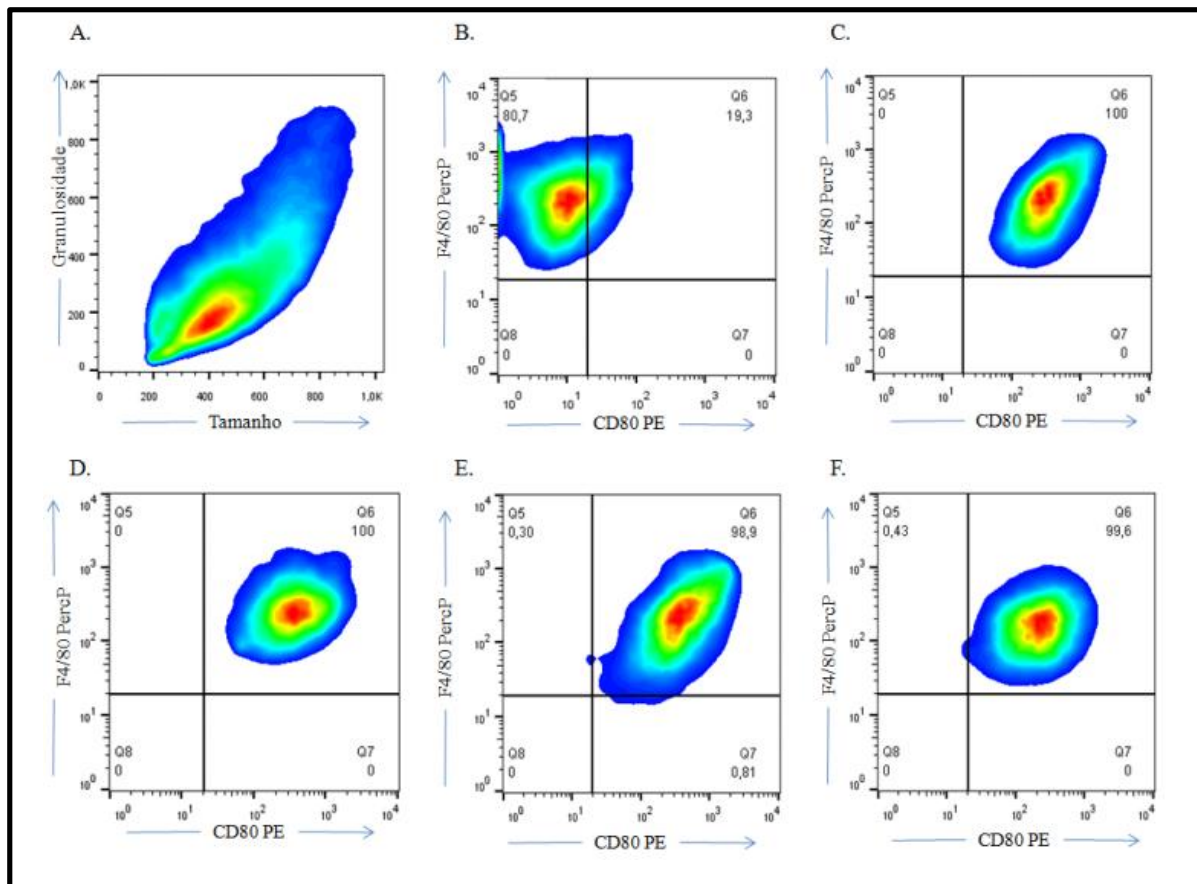


Figura 20: Avaliação da molécula apresentadora de antígenos CD80, em macrófagos infectados com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*. A) Seleção da população de células do conteúdo peritoneal de camundongos BALB/c B) Percentual de CD80 em macrófagos não infectados. C) Percentual de CD80 em macrófagos na presença de zimosan A D) Percentual de CD80 em macrófagos infectados com a cepa Arequipa. E) Percentual de CD80 em macrófagos infectados com a cepa Colombiana e F) Percentual de CD80 em macrófagos infectados com o clone CL Brener. O percentual de CD80 em macrófagos peritoneais mostram-se no Q6.

Os resultados da análise estatística mostraram que 3 horas após a infecção inicial, não houve diferenças significativas na expressão do CD80 entre as cepas Arequipa ($95,8 \pm 1,4\%$), Colombiana ($97,0 \pm 1,3\%$) e clone CL Brener ($94,8 \pm 0,9\%$), assim como na presença do zimosan A ($96,9 \pm 1,1\%$). No entanto, observou-se diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão do CD80 entre os macrófagos infectados ou na presença de zimosan A, quando foram comparados com o controle de macrófagos não infectados ($20,5 \pm 1,9\%$) (Fig. 21).

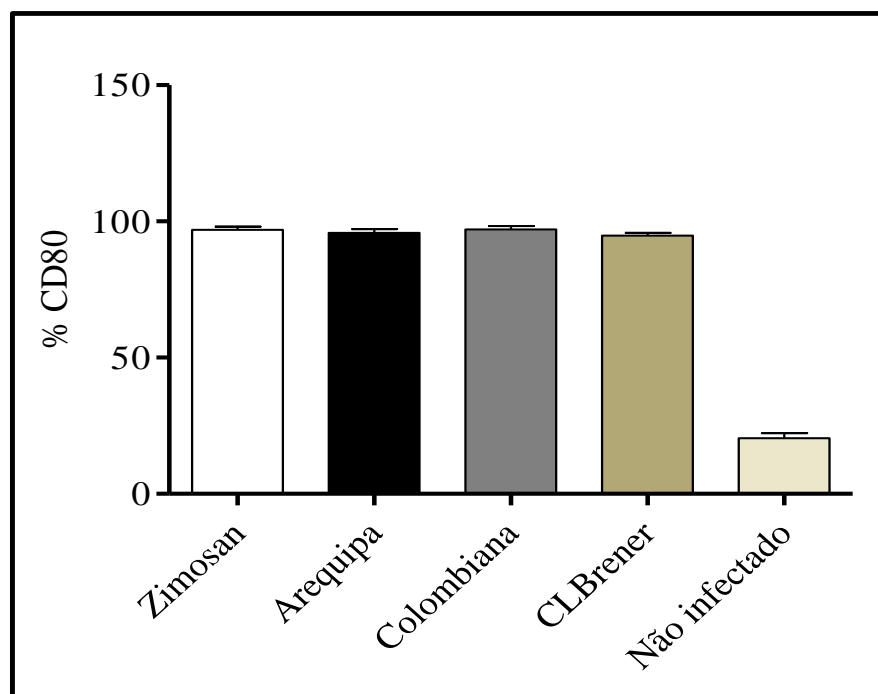


Figura 21: Percentual de ativação da molécula apresentadora de antígenos CD80, em macrófagos infectados com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* ou na presença de zimosan A. Houve diferenças significativas ($p < 0.05$) em relação ao grupo de macrófagos não infectados.

5.1.3.2 Avaliação da produção intracelular de EROs e NO por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c após internalização das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

As análises da produção intracelular de EROs e NO foram realizadas para determinar os mecanismos efetores dos macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c, após a internalização de tripomastigotas das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* ou na presença de zimosan A. Inicialmente, as células do conteúdo peritoneal foram representados através do perfil de dispersão celular, de tamanho *versus* granulosidade (Fig. 22A). Posteriormente, os macrófagos foram selecionados por suas características morfométricas e imunofenotípicas, através de gráficos de distribuição pontual de FL3 – F4/80 PerCP *versus* FL2 – CD80 PE, onde o percentual destas células foi de 91,2% (Fig. 22B). Após a seleção da região de interesse (R1), a mesma foi avaliada para verificar a produção de NO intracelular, através da construção de gráficos FL3 – F4/80 PerCP *versus* FL1 - DAF-2T, onde o percentual de desta molécula foi de 5,2% (Fig. 22C), assim como para verificar a produção de EROs intracelular, através da construção de gráficos FL3 – F4/80 PerCP *versus* FL1 -

H2DCFDA, onde o percentual desta molécula foi de 8,9% (Fig. 22D). Após a seleção da região de interesse (R1), também foi avaliada a inibição da produção de NO intracelular, em macrófagos peritoneais tratados previamente com aminoguanidina (AG), onde o percentual desta molécula após a inibição foi de 2,3% (Fig. 22E), assim como a inibição da produção de EROs intracelular, em macrófagos peritoneais tratados previamente com *diphenyleneiodonium chloride* (DPI), onde o percentual desta molécula após a inibição foi de 3,1% (Fig. 22F).

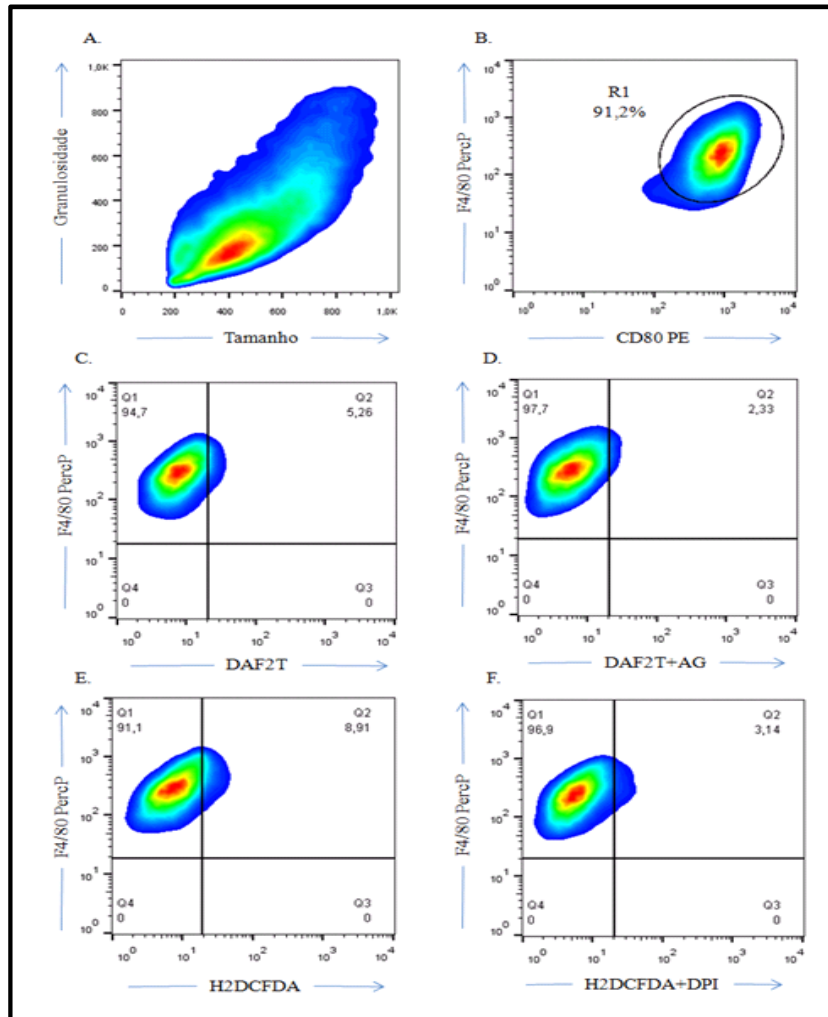


Figura 22: Imagem representativa da produção intracelular de óxido nítrico (NO) e espécies reativas do oxigênio (EROs) por macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c e infectados com a cepa Arequipa de *T. cruzi*. A) Seleção da população de células do conteúdo peritoneal de camundongos BALB/c B) Perfil de distribuição celular, FL3 – F4/80 PerCP versus FL2 – CD80 PE. C) Perfil de distribuição celular, FL3 – F4/80 PerCP versus FL1 - DAF-2T da população selecionada na janela R1 do gráfico A. A produção de NO foi obtida a partir do quadrante 2 (Q2). D) Perfil de distribuição celular, FL3 - F4/80 PerCP versus FL1 - DAF-2T + AG da população selecionada na janela R1 do gráfico A. A inibição de NO foi obtida a partir do quadrante 2 (Q2). E) Perfil de distribuição celular, FL3 – F4/80 PerCP versus FL1 - H2DCFDA da população selecionada na janela R1 do gráfico A. A produção de EROs foi obtida a partir do quadrante 2 (Q2). F) Perfil de distribuição celular, FL3 – F4/80 PerCP versus FL1 - H2DCFDA + DPI da população selecionada na janela R1 do gráfico A. A inibição da produção de EROs foi obtida a partir do quadrante 2 (Q2).

Os resultados da análise estatística mostraram que 3 horas após a infecção inicial houve diferença significativa ($p < 0.05$) na produção de NO por macrófagos na presença de zimosan A ($8,4 \pm 1,9\%$), quando foi comparado com macrófagos infectados com as cepas Arequipa ($6,2 \pm 1,8\%$), Colombiana ($5,2 \pm 0,5\%$) e clone CL Brener ($3,9 \pm 1,5\%$) e também em relação ao controle de macrófagos não infectados ($0,5 \pm 0,2\%$). Do mesmo modo, observou-se que houve uma diferença significativa ($p < 0.05$) na produção de NO por macrófagos infectados com a cepa Arequipa, quando foi comparado com macrófagos infectados com o clone CL Brener (Fig. 23A). Por outro lado, os resultados da análise estatística mostraram que 3 horas após a infecção inicial houve uma diferença significativa ($p < 0.05$) na produção de EROs por macrófagos na presença de zimosan A ($17,1 \pm 5,7\%$), quando foi comparado com macrófagos infectados com as cepas Arequipa ($9,5 \pm 2,9\%$), Colombiana ($8,4 \pm 2,0\%$) e clone CL Brener ($7,5 \pm 3,4\%$) e também em relação ao controle de macrófagos não infectados ($0,5 \pm 0,1\%$) (Fig. 23B).

Por outro lado, os resultados mostraram que macrófagos na presença de zimosan A e tratados com AG, apresentaram uma redução aproximada de 76% na produção de NO. Do mesmo modo, os macrófagos infectados com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener e tratados com AG, apresentaram uma redução aproximada de 52,9%, 67% e 43,7%, respectivamente. A análise estatística mostrou diferenças significativas ($p < 0.05$) na produção de NO por macrófagos infectados com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* ou na presença de zimosan A, quando foram comparados com macrófagos tratados com AG e infectados com as mesmas cepas, Arequipa ($2,9 \pm 1,2\%$), Colombiana ($1,5 \pm 0,5\%$) e clone CL Brener ($1,9 \pm 0,4\%$) ou na presença de zimosan A ($2,5 \pm 1,1\%$;) (Fig. 23C). De maneira semelhante, os resultados mostraram que macrófagos na presença de zimosan A e tratados com DPI apresentaram uma redução aproximada de 75,7% na produção de EROs. Do mesmo modo, os macrófagos infectados com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener e tratados com DPI, apresentaram uma redução aproximada de 52,9%, 73,3% e 46,4%, respectivamente. A análise estatística mostrou diferenças significativas ($p < 0.05$) na produção de EROs por macrófagos infectados com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* ou na presença de zimosan A, quando foram comparados com macrófagos tratados com DPI e infectados com as mesmas cepas Arequipa ($3,5 \pm 0,5\%$), Colombiana ($2,0 \pm 0,4\%$) e clone CL Brener ($3,0 \pm 0,8\%$) ou na presença de zimosan A ($3,7 \pm 1,1\%$;) (Fig. 23D).

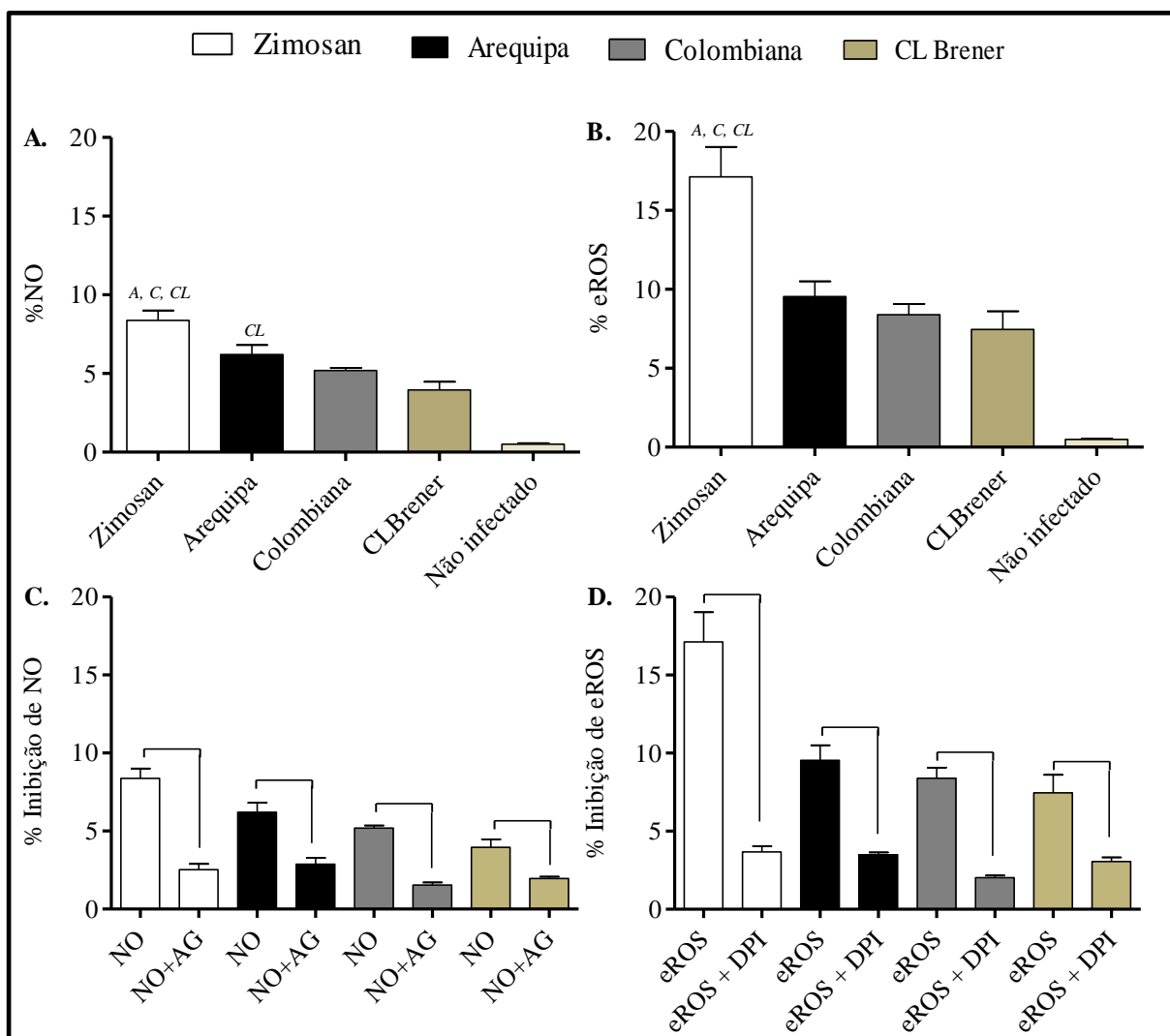


Figura 23: Produção intracelular de NO e EROs em macrófagos infectados com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* ou na presença de zimosan. A) Produção de NO intracelular após 3 horas de infecção ou incubação com zimosan. B) Produção de EROs intracelular após 3 horas de infecção ou incubação com zimosan. C) Inibição da produção de NO pela ação de AG (inibidor da iNOS). D) Inibição da produção de EROs por DPI (inibidor da NADPH oxidase). A linha conectora representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos grupos infectados e tratados com AG ou DPI. A: representa diferença significativa ($p < 0,05$) da produção de NO ou EROs em relação à cepa Arequipa. C: representa uma diferença significativa ($p < 0,05$) da produção de NO ou EROs em relação à cepa Colombiana. CL: representa uma diferença significativa ($p < 0,05$) da produção de NO ou EROs em relação ao clone CL Brener.

Neste estudo foram realizadas análises de correlação entre a produção de EROs e NO com o processo de fagocitose dos tripomastigotas das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*. Desta forma, os resultados mostraram uma correlação significativa na produção de NO que foi diretamente proporcional com o processo de fagocitose dos tripomastigotas da cepa Arequipa ($p < 0,0001$; $r^2 = 0,7404$) (Fig. 24A); da cepa Colombiana ($p < 0,0001$; $r^2 = 0,7847$) (Fig. 24B) e do clone CL Brener ($p < 0,0001$; $r^2 = 0,6668$) (Fig. 24C). Da

mesma forma, observou-se também uma correlação significativa na produção de EROs que foi diretamente proporcional com o processo de fagocitose da cepa Arequipa ($p < 0,0001$; $r^2 = 0,7489$) (Fig. 24D); da cepa Colombiana ($p < 0,0001$; $r^2 = 0,6766$) (Fig. 24E) e do clone CL Brener ($p < 0,0001$; $r^2 = 0,6465$) (Fig. 24F).

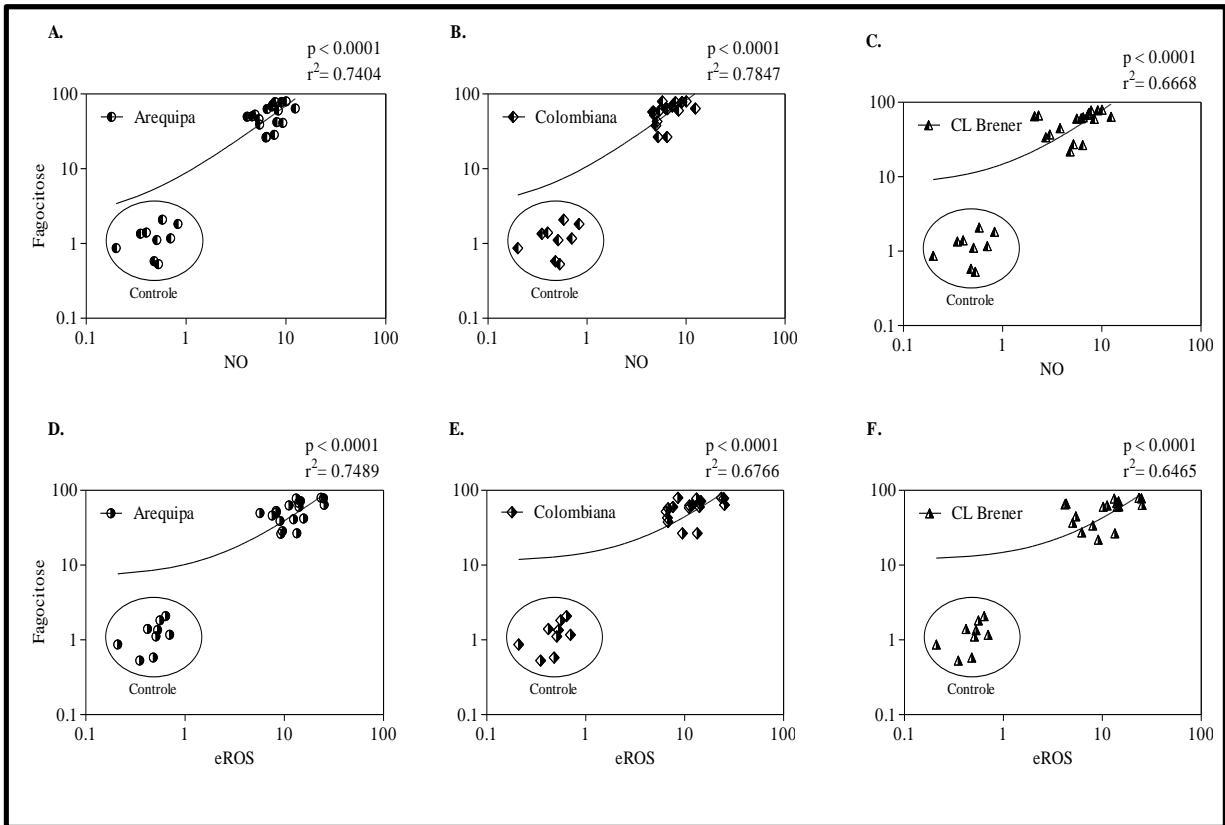


Figura 24: Correlação entre a produção de EROs e NO versus o processo de fagocitose dos tripomastigotas das cepas Arequipa, Colombiana e do clone CL Brener de *T. cruzi*. A) Correlação do processo de fagocitose de tripomastigotas da cepa Arequipa versus a produção de NO. B) Correlação do processo de fagocitose de tripomastigotas da cepa Colombiana versus a produção de NO. C) Correlação do processo de fagocitose de tripomastigotas do clone CL Brener versus a produção de NO. D) Correlação do processo de fagocitose de tripomastigotas da cepa Arequipa versus a produção de EROs. E) Correlação do processo de fagocitose de tripomastigotas da cepa Colombiana versus a produção de EROs. F) Correlação do processo de fagocitose de tripomastigotas do clone CL Brener versus a produção de EROs. As diferenças significativas ($p < 0,0001$), os coeficientes de Spearman (r) e as curvas de regressão linear estão apresentados nos gráficos.

5.1.4 Análise bioinformática das sequências gênicas das enzimas antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

5.1.4.1 Mapeamento das reads e montagem das sequências dos genes antioxidantes da cepa Arequipa e Colombiana de *T. cruzi*

Neste trabalho foram avaliadas as sequências nucleotídicas das principais enzimas antioxidantes que compõem a defesa bioquímica de *T. cruzi* frente ao ambiente nitroxidativo dos macrófagos. Neste sentido, as *reads* geradas com o método de sequenciamento *whole genome shotgun*, usando as plataformas 454 e *Ion Torrent*, dos genomas das cepas Arequipa e Colombiana de *T. cruzi*, foram mapeadas em genes anotados como: “*Ascorbate-dependent peroxidase*”, “*Iron superoxide dismutase*”, *Trypanothione reductase*”, “*Trypanothione synthetase*” e “*Tryparedoxin peroxidase*”, que codificam enzimas antioxidantes no genoma de referência (CL Brener haplótipo *Esmo like*) obtido da base de dados TritypDB.org (<http://tritypdb.org/tritypdb/>). As *reads* derivadas do mapeamento para cada gene foram montadas usando o programa Cap3 (*Contig Assembly Program*), a partir do qual foram obtidos os *contigs* de cada um dos genes em questão (Fig 25).

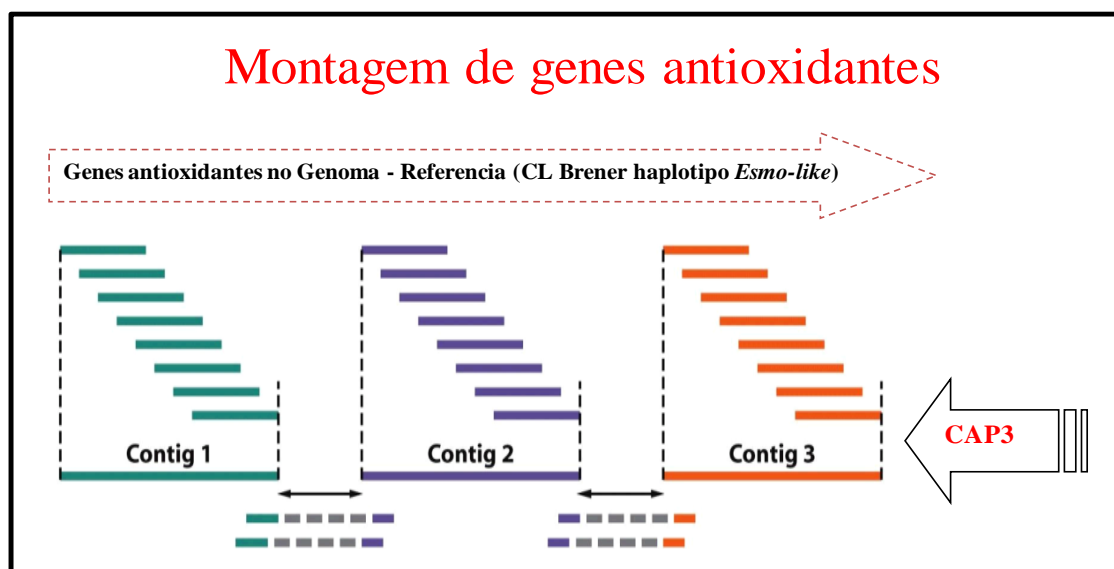


Figura 25: Montagem das *reads* dos genes antioxidantes de *T. cruzi* no genoma de referência. Representação esquemática da montagem dos *reads* nas sequências dos genes antioxidantes presentes no genoma de referência (CL Brener haplótipo *Esmo like*), obtido da base de dados TritypDB.org.

Posteriormente, os *contigs* gerados para cada um dos genes antioxidantes foram alinhados junto com a sequência nucleotídica procedente do mesmo gene obtido do genoma de referência (CL Brener haplótipo *Esmo like*). A qualidade deste alinhamento foi avaliada utilizando o programa *Contig Editor* (http://genestudio.com/genestudio/contig_editor/overview), o qual fornece ferramentas para a montagem e edição de sequências nucleotídicas. Desta forma, foi possível determinar a sequência consenso para cada um dos genes antioxidantes, presentes no genoma da cepa Arequipa e Colombiana de *T. cruzi*: TcCLB.503745.30 (TcAPX) (Fig 26A), TcCLB.509499.14 (TcMPX) (Fig 26B), TcCLB.487507.10 (TcCPX) (Fig 26C), TcCLB.509775.40 (TcSodA) (Fig 26D), assim como para os genes TcCLB.511715.10 (TcSodB) (Fig 27A), TcCLB.504507.5 (TcTrR) (Fig 27B) e TcCLB.509099.50 (TcTrS) (Fig 27C). Finalmente, as sequências consenso foram utilizadas para o desenho de *primers* específicos com o programa *Eprimer3* no *Emboss Explorer* (<http://bioinfo.nhri.org.tw/cgi-bin/emboss/eprimer3>) (Tabela 5), os quais permitiram a amplificação e posterior clonagem dos genes antioxidantes das cepas de *T. cruzi* avaliadas neste estudo.

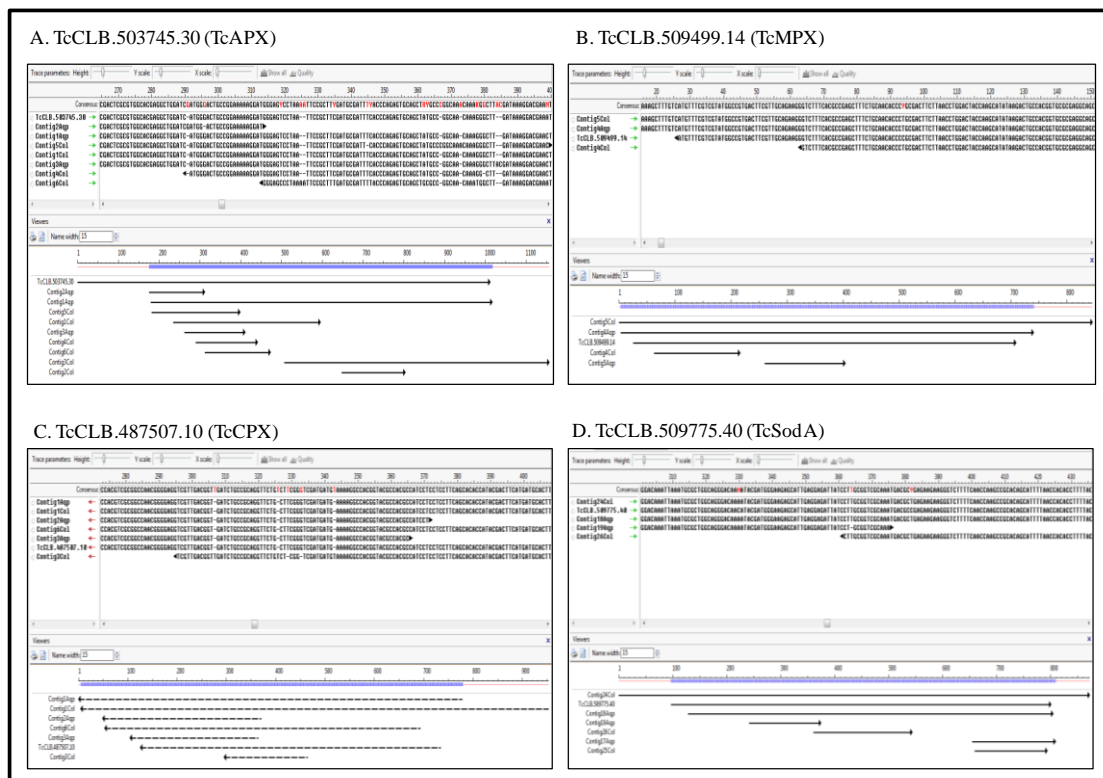


Figura 26: Alinhamento dos *contigs* dos genes antioxidantes das cepas Arequipa e Colombiana de *T. cruzi*. Avaliação dos *contigs* de cada um dos genes antioxidantes e geração das sequências consenso com o programa *Contig Editor*. **A.** Gene TcCLB.503745.30 (TcAPX). **B.** Gene TcCLB.509499.14 (TcMPX). **C.** Gene TcCLB.487507.10 (TcCPX). **D.** Gene TcCLB.509775.40 (TcSodA)



Figura 27: Alinhamento dos *contigs* dos genes antioxidantes das cepas Arequipa e Colombiana de *T. cruzi*. Avaliação dos *contigs* de cada um dos genes antioxidantes e geração das seqüências consenso com o programa *Contig Editor*. A. Gene TcCLB.511715.10 (TcSodB). B. Gene TcCLB.504507.5 (TcTrR). C. Gene TcCLB.509099.50 (TcTrS).

Tabela 5: *Primers* desenhados com o programa *Eprimer3*, para as análises de estimativa de número de cópias e de expressão gênica das enzimas antioxidantes de *T. cruzi*.

| ID | Primers | Tamanho |
|--------|-----------------------------------|---------|
| TcAPX | ApxF 5'-GGAAAAAGGATGGGAGTCCT-3' | 151 pb |
| | ApXR 5'-AAGGACCATAATCGGCGTA-3' | |
| TcCPX | CpxF 5'-TCTACCCGATGGACTTCACC-3' | 239 pb |
| | CpXR 5'-CTCCTCCTTCAGCACACCAT-3' | |
| TcMPX | MpxF 5'-AGCCTTTTCAGATGCTCAGG-3' | 249 pb |
| | MpXR 5'-CGCAGAATCCCTTTATCGTC-3' | |
| TcSodA | SodAF 5'-GTGGACCCGTCGAATAAGAA-3' | 169 pb |
| | SodAR 5'-TGACCGACCAGATCTCCTTC-3' | |
| TcSodB | SodBF 5'-TGCGAAGTTCAAGGAGGAGT-3' | 144 pb |
| | SodBR 5'-AAGTTGGGCTCTGTCAAGTGG-3' | |
| TcTrR | TrRF 5'-ATTGCATCAGCAGCAATGAG-3' | 198 pb |
| | TrRR 5'-TTGTGAGTTCCTCACGGAGA-3' | |
| TcTrS | TrSF 5'-CAAAACCATCGGTTTCAAA-3' | 198 pb |
| | TrSR 5'-CCGTTTGAAGTGAAGCGACT-3' | |

5.1.4.2 Avaliação *in silico* do número de cópias das sequências gênicas das enzimas antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Vários estudos têm revelado que a variação do número de cópias gênicas é um fenômeno comum em tripanossomatídeos (MINNING *et al.*, 2011; GENOIS *et al.*, 2014; REIS-CUNHA *et al.*, 2015). Tais eventos de duplicação gênica podem aumentar a expressão de genes, afetando o fitness dos parasitos (REIS-CUNHA *et al.*, 2015; GENOIS *et al.*, 2014; UBEDA *et al.*, 2008). A fim de se estimar o número de cópias dos genes oxidantes nas diferentes cepas usadas neste estudo e buscar correlacionar com níveis de expressão gênica e virulência das cepas, inicialmente foi realizada a montagem das sequências gênicas das enzimas antioxidantes das cepas Arequipa e Colombiana usando-se as reads do sequenciamento dos genomas. As sequências gênicas das enzimas antioxidantes do clone CL Brener (haplótipo *Esmo-like*) foram obtidas do banco de dados *Trityp.org*. As reads de cada uma destas cepas foram mapeadas nas sequências montadas dos genes antioxidantes das respectivas cepas. O número de cópias dos genes antioxidantes foi determinado com base na profundidade ou cobertura das *reads* dos genomas das cepas de *T. cruzi* avaliadas neste estudo, normalizada pela cobertura dos respectivos genomas (número de vezes que cada genoma é representado pelas reads geradas). Para tanto, foram utilizadas ferramentas de mapeamento/processamento de *reads* e scripts em *Perl*, permitindo a predição de número de cópias gênicas baseado em arquivos de mapeamento 0 (MQ 0). Os resultados não mostraram grandes variações no número de cópias dos genes TcAPX, TcMPX, TcTrR, TrS e TcSodB entre as cepas Arequipa (~1,6; ~1,5; ~3,05; ~1,9 e ~2,03; respectivamente), Colombiana (~1,8; ~1,3; ~2,4; ~1,7 e ~2,1; respectivamente) e clone CL Brener (~1,9; ~1,8; ~3,2; ~1,7 e ~2,2; respectivamente) de *T. cruzi*. Entre tanto, observou-se uma diferença de cerca de duas vezes no número de cópias do gene TcCPX no genoma do clone CL Brener (~10,7), quando comparado com a cepa Arequipa (~5,9) e Colombiana (~5,6) e também uma diferença de duas vezes no número de cópias do gene TcSodA no genoma da cepa Colombiana (~2,09) e do clone CL Brener (~2,74), quando comparado com a cepa Arequipa (~1,3) (Fig. 28 e 29).

| Genes | Arequipa | | | Colombiana | | | CL Brener | | |
|--------|------------|-------|---------|------------|-------|---------|------------|--------|---------|
| | % coverage | RDC | Diploid | % coverage | RDC | Diploid | % coverage | RDC | Diploid |
| TcAPX | 96.28 | 20.93 | 1.65 | 96.72 | 15.1 | 1.82 | 98.79 | 85.16 | 1.90 |
| TcCPX | 91.29 | 75.99 | 5.99 | 89.3 | 46.76 | 5.64 | 92.13 | 480.56 | 10.72 |
| TcMPX | 91.02 | 19.94 | 1.57 | 89.13 | 11.09 | 1.34 | 97.04 | 84.03 | 1.87 |
| TcSodA | 96.56 | 16.86 | 1.33 | 93 | 17.35 | 2.09 | 95.18 | 122.7 | 2.74 |
| TcSodB | 90.43 | 38.7 | 3.05 | 89.62 | 20.28 | 2.45 | 89.62 | 143.21 | 3.20 |
| TcTrR | 98.54 | 24.4 | 1.92 | 99.3 | 14.32 | 1.73 | 99.36 | 79.99 | 1.78 |
| TcTrS | 98.66 | 25.78 | 2.03 | 98.81 | 17.62 | 2.13 | 100 | 101.69 | 2.27 |

Figura 28: Avaliação do número de cópias *in silico* dos genes antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e do clone CL Brener de *T. cruzi*. TcAPX (gene Ascorbate Peroxidase), TcTrS (gene Triparedoxin Sintetase), TcMPX (gene Peroxiredoxin Mitocondrial), TcTrR (gene Triparedoxin Redutase), TcSodA (gene Superóxido Dismutase A), TcSodB (gene Superóxido Dismutase B) e TcCPX (gene Peroxiredoxin Citosólica). % coverage: porcentagem da extensão do gene coberta pelas reads; RDC: read depth coverage – número médio de vezes que cada nucleotídeo do gene é representado pelas reads; Diploid: estimativa do número de cópias no genoma diplóide.

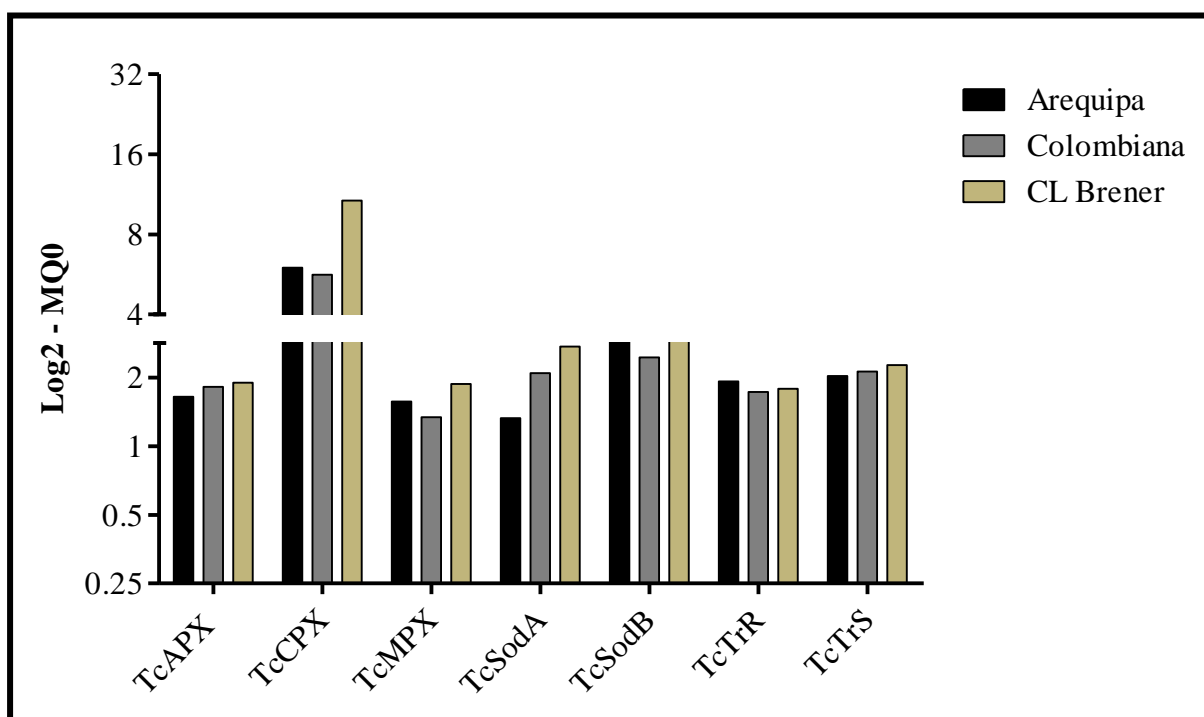


Figura 29: Número de cópias preditas *in silico* dos genes antioxidantes nas cepas Arequipa, Colombiana e no clone CL Brener de *T. cruzi*. Avaliação do número de cópias das sequências nucleotídicas dos genes antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*. TcAPX (gene Ascorbate Peroxidase), TcTrS (gene Triparedoxin Sintetase), TcMPX (gene Peroxiredoxin Mitocondrial), TcTrR (gene Triparedoxin Redutase), TcSodA (gene Superóxido Dismutase A), TcSodB (gene Superóxido Dismutase B) e TcCPX (gene Peroxiredoxin Citosólica).

5.1.5 Análise molecular das sequências gênicas das enzimas antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

5.1.5.1 Avaliação do número de cópias das sequências gênicas das enzimas antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* por PCR em tempo real.

A fim de confirmar os resultados obtidos de estimativa de número de cópias dos genes antioxidantes preditas *in silico*, avaliamos o número de cópias destes genes *in vitro*, através do método de quantificação relativa em tempo real. Neste método foi utilizado como controle endógeno de quantificação o gene de cópia única TcP2a (RNAr - P2 α). Inicialmente, todas as sequências dos genes antioxidantes foram amplificadas por PCR convencional, utilizando *primers* desenhados de acordo com o item 4.6.2. Desta forma, foram avaliados e verificados os tamanhos em pares de bases (pb) de cada um dos genes antioxidantes e do gene de cópia única (Fig. 30A). Por outro lado, também foi avaliada a especificidade da amplificação, de cada uma das sequências dos genes antioxidantes, através do PCR em tempo real, verificando as respectivas temperaturas de *melting* (T_m), geradas pelas curvas de dissociação de cada produto amplificado (Fig. 30B).

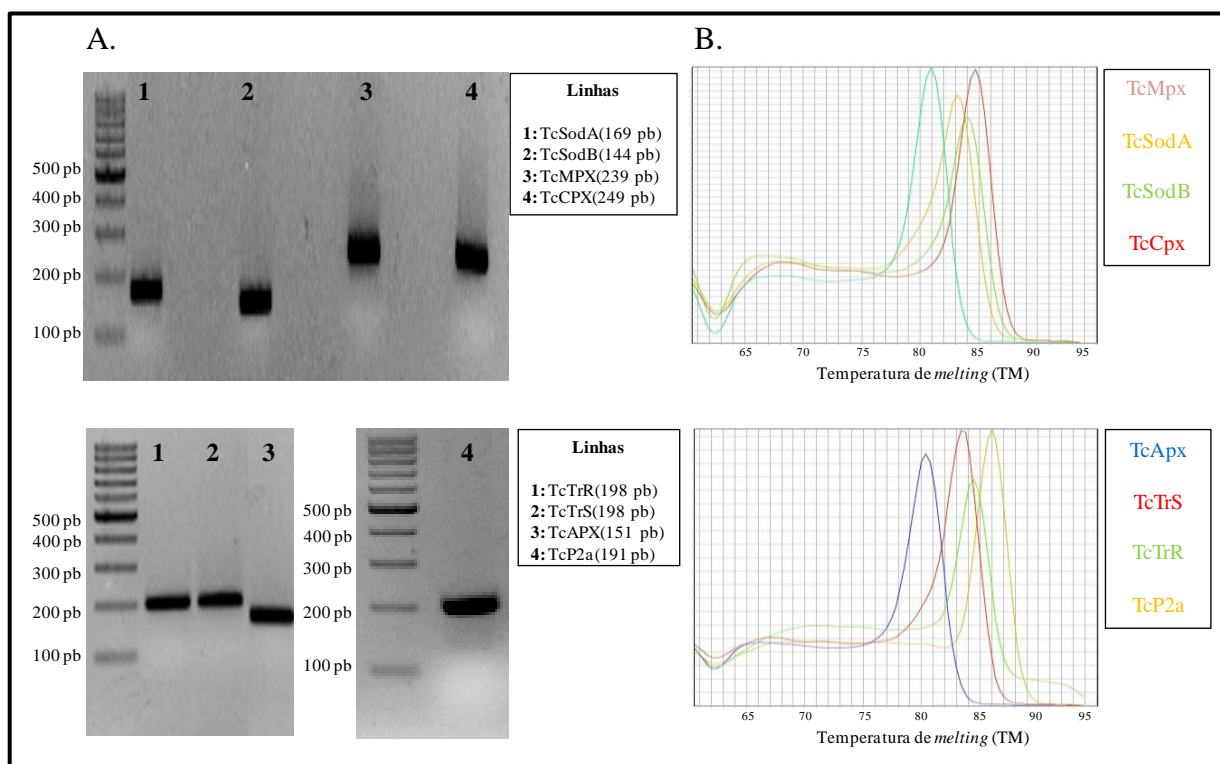


Figura 30: Amplificação das sequências dos genes antioxidantes de *T. cruzi*. **A)** Amplificação por PCR convencional em gel de agarose 2%, visualização do tamanho em pb esperado para cada sequência gênica. **B)** Amplificação por PCR Real time – *Syber Green I*, avaliação da especificidade dos produtos amplificados através das temperaturas de *melting*. TcAPX (Tm=80.3), TcTrS (Tm=83.5), TcTrR (Tm=84.4), TcP2a (Tm=85.9), TcMPX (Tm=80.8), TcCPX (Tm=84.7), TcSodA (Tm=83.1), TcSodB (Tm=83.9).

Uma vez obtidos os produtos de amplificação das sequências dos genes antioxidantes e do gene de cópia única, estes foram purificados, clonados no vetor *pGEM-T easy* (Promega) com a finalidade de gerar padrões para a quantificação por PCR em tempo real. Inicialmente, avaliamos a eficiência da clonagem dos genes antioxidantes mediante o PCR convencional, tendo como *template* o DNA das colônias isoladas de bactérias, com os *primers* M13 – F13 que flanqueiam o sítio de clonagem do vetor *pGEM-T easy* juntamente ao inserto contendo as sequências clonadas dos genes antioxidantes (Fig. 31).

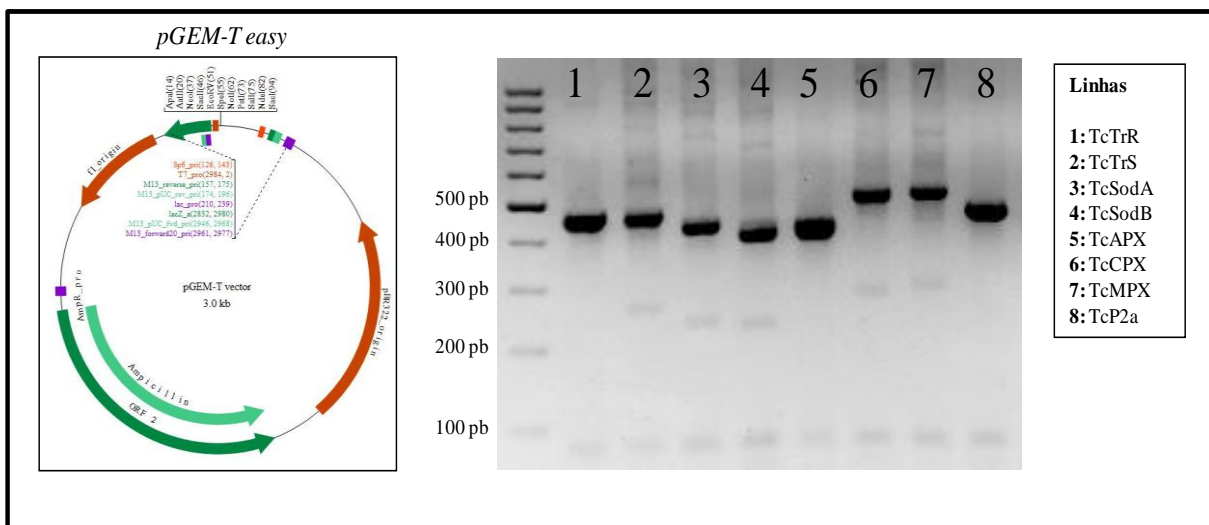


Figura 31: Clonagem das sequências dos genes antioxidantes de *T. cruzi* no vetor *pGEM-T easy*. Amplificação por PCR convencional para verificar o tamanho esperado para cada sequência gênica.

Posteriormente, foram purificadas as sequências gênicas clonadas (plasmídeos) (Fig. 32A). A concentração total do DNA plasmidial foi medida e normalizada numa concentração inicial de 35 ng/ul, o que representa quantitativamente a 10^{10} cópias para cada sequência gênica clonada. (Fig. 32B). Finalmente a concentração inicial do DNA plasmidial foi submetido a diluições seriadas (1:10) para gerar a curva padrão, a partir de 10^{10} até 10^0 cópias. Uma curva padrão foi desenhada independente para cada uma das sequências dos genes antioxidantes e para o controle endógeno ou gene de cópia única (controle de quantificação).

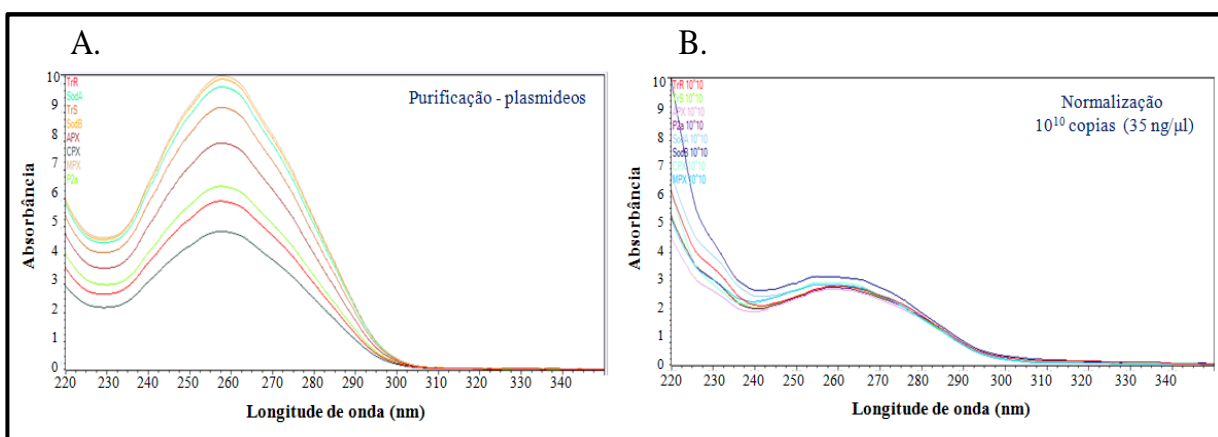


Figura 32: Purificação e normalização do DNA plasmidial contendo as sequências gênicas antioxidantes de *T. cruzi*. **A)** Determinação da concentração do DNA plasmidial. **B)** Normalização em 35 ng/ul (10^{10} cópias).

A curva padrão para cada um dos genes antioxidantes foi avaliada por PCR em tempo real. A linearidade e o *slope* determinaram a eficiência da amplificação e a confiabilidade dos resultados. Os gráficos de cada curva padrão mostraram uma linearidade ótima para os genes TcP2a ($r^2= 0.998$; $\text{slope} = -3,29$), TcAPX ($r^2= 0.995$; $\text{slope} = -3,15$), TcTrS ($r^2= 0.992$; $\text{slope} = -3,33$), TcTrR ($r^2= 0.998$; $\text{slope} = -3,55$) e TcMPX ($r^2 = 0.969$; $\text{slope} = -3,1$) (Fig. 33). Por outro lado, as curvas padrão para os genes TcCPX ($r^2 = 0.964$; $\text{slope} = -4,05$), TcSodA ($r^2 = 0.969$; $\text{slope} = -4,68$) e TcSodB ($r^2 = 0.882$; $\text{slope} = -3,66$) mostraram um baixo *slope* e linearidade (Fig. 34).

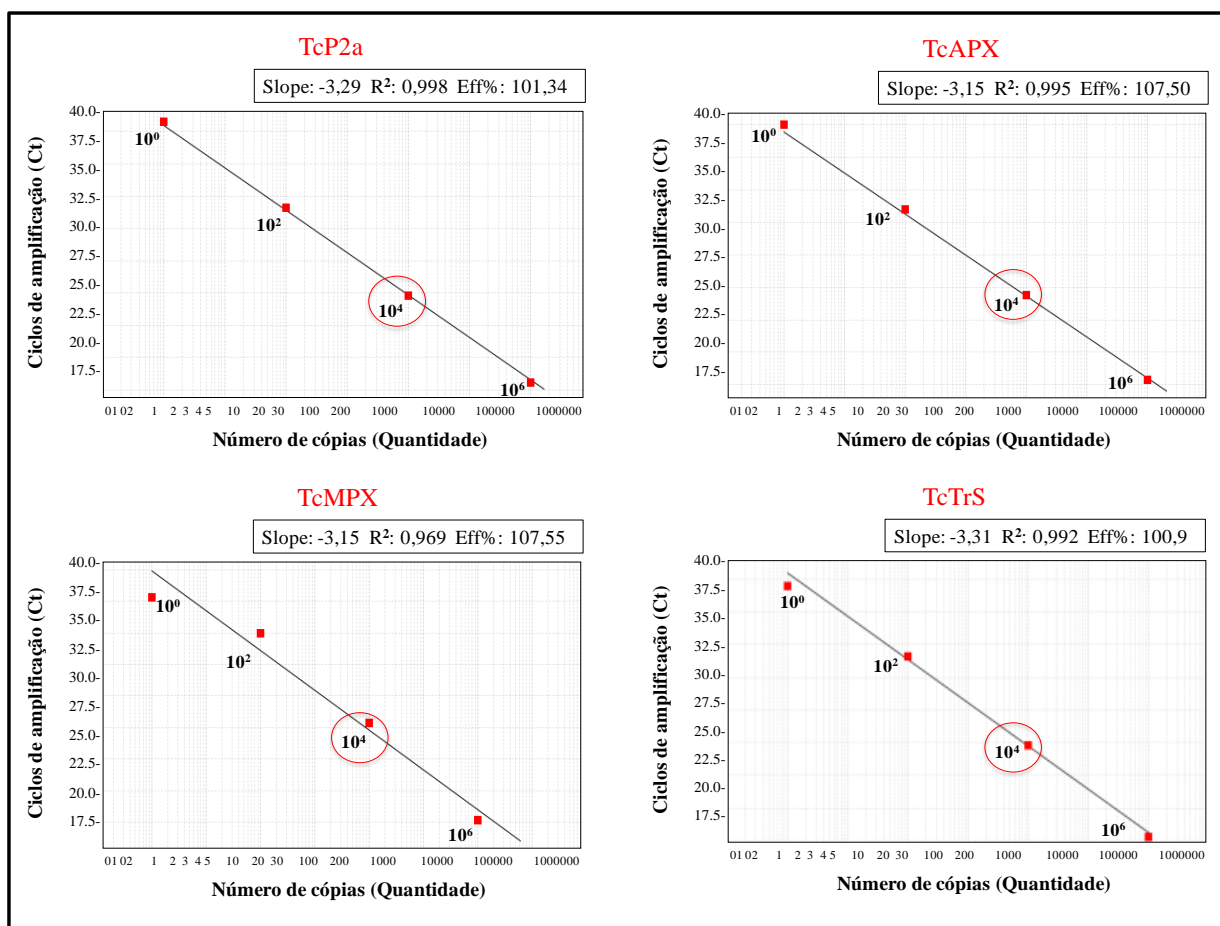


Figura 33: Eficiência da amplificação, linearidade e *slope* para o desenho da curva padrão. A) Diluições 10^6 a 10^0 cópias dos genes TcP2a (gene RNAr P2alpha – cópia única), TcAPX (gene Ascorbate Peroxidase), TcTrS (gene Triparedoxin Sintetase) e TcMPX (gene Peroxiredoxin Mitocondrial).

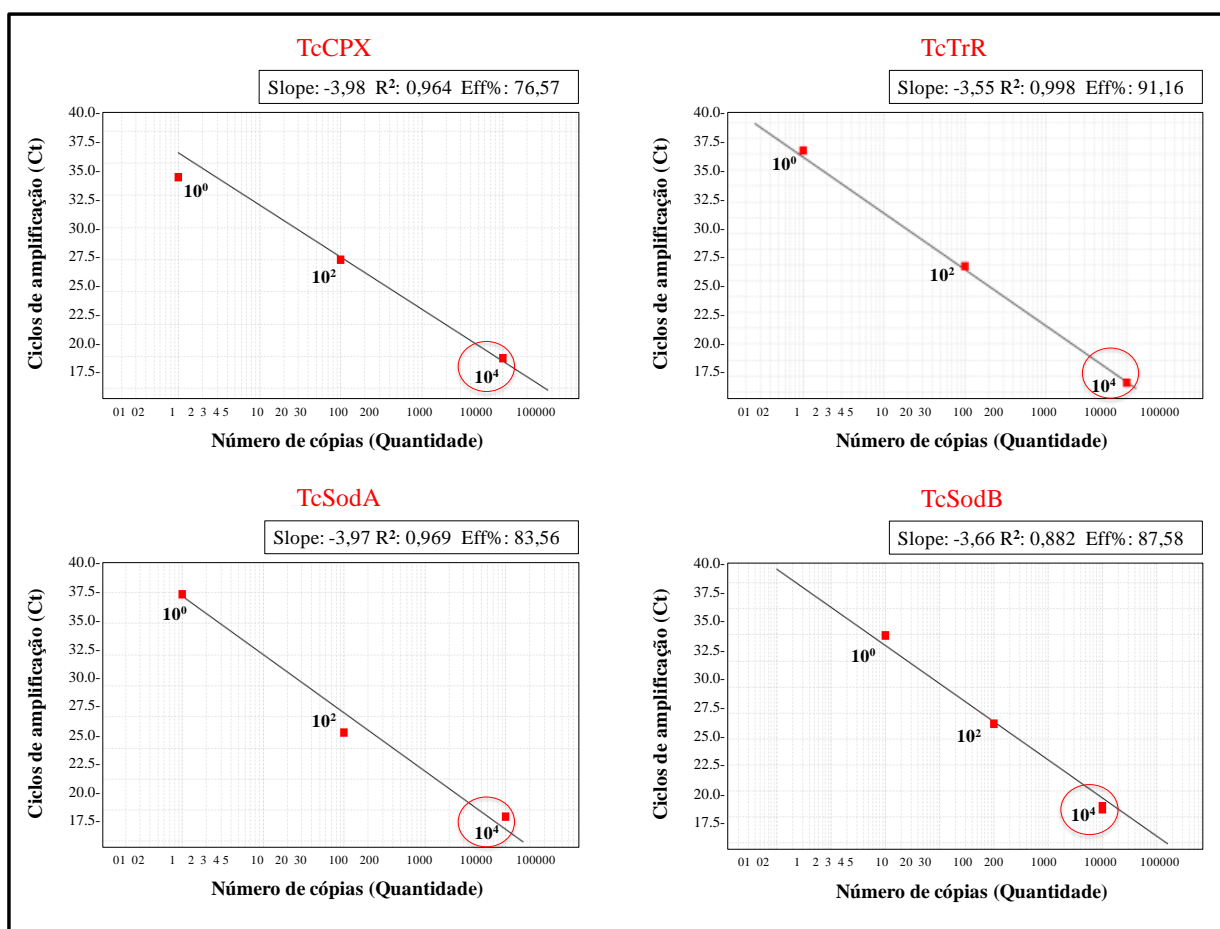


Figura 34: Eficiência da amplificação, linearidade e slope para o desenho da curva padrão. Diluições 10^4 a 10^0 cópias dos genes TcTrR (gene Triparedoxin Redutase), TcSodA (gene Superóxido Dismutase A), TcSodB (gene Superóxido Dismutase B) e TcCPX (gene Peroxiredoxin Citosólica).

Avaliamos a reprodutibilidade da amplificação de cada ponto de diluição da curva padrão, para cada um dos genes antioxidantes de *T. cruzi* e para o controle endógeno de quantificação (TcP2a) ($n=3$, $p < 0.01$), sendo que a diluição otimizada com uma reprodutibilidade e confiabilidade de 100% foi 10^4 cópias, com uma média do ciclo de *threshold* (Ct) = 22,45. Deste modo, também foi obtida a ΔCt (Variação do Ct) para cada gene antioxidante clonado (calibrador), o qual foi a resultante da diferença entre o Ct do controle endógeno de quantificação (TcP2a) e o Ct dos calibradores (Tabela 6). Finalmente, avaliamos o número de cópias *in vitro* de cada um dos genes antioxidantes utilizando os calibradores otimizados.

Tabela 6: Média do ciclo de *threshold* (Ct) da curva padrão de cada um dos genes antioxidantes e do controle endógeno de *T. cruzi*

| Curva Padrão | Ct média | Diluição otimizada | Gene calibrador | Ct Média | ΔCt |
|--------------|----------|-------------------------|-----------------|----------|-------------|
| | | | TcP2a | 22.4106 | 0,0000 |
| | | | TcAPX | 22.4408 | -0,0302 |
| 10^{10} | 5.0992 | Plasmídeo 10^4 cópias | TcCPX | 22.4520 | -0,0413 |
| 10^8 | 10.1327 | | TcMPX | 22.4484 | -0,0377 |
| 10^6 | 16.2352 | | TcSodA | 22.4892 | -0,0785 |
| 10^4 | 22.4532 | | TcSodB | 22.4372 | -0,0265 |
| 10^2 | 28.5514 | | TcTrS | 22.4699 | -0,0592 |
| 10^0 | 34.8312 | | TcTrR | 22.4969 | -0,05608 |

Para determinar o número de cópias dos genes antioxidantes *in vitro*, o DNA genômico das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* foram submetidos à amplificação e posterior quantificação relativa por PCR em tempo real. Neste método, a quantidade do DNA genômico das cepas de *T. cruzi* avaliadas neste estudo, foi normalizado utilizando o controle endógeno de quantificação (TcP2a - gene de cópia única). Além da normalização, o número de cópias dos genes antioxidantes foi determinado utilizando a fórmula $N = 2^{\Delta\Delta Ct}$. Deste modo, foi calculado o valor $\Delta\Delta Ct$, que significa a relação da ΔCt dos genes antioxidantes e do gene de cópia única com a ΔCt dos calibradores (genes clonados) (Tabela 7).

Tabela 7: Número de cópias dos genes antioxidantes das cepas de *T. cruzi*

| Genes/Cepas | Ct Mean | ΔCt | $\Delta\Delta Ct$ | $2^{\Delta\Delta Ct}$ |
|---------------|---------|-------------|-------------------|-----------------------|
| *TcP2a | | | | |
| Arequipa | 15,9294 | 0 | 0 | 1 |
| Colombiana | 14,1883 | 0 | 0 | 1 |
| CLBrener | 17,7416 | 0 | 0 | 1 |
| TcAPX | | | | |
| Arequipa | 15,9251 | 0,0043 | 0,0345 | 1,0242 |
| Colombiana | 15,3793 | -1,1910 | -1,1607 | 0,4472 |
| CLBrener | 18,2469 | -0,5053 | -0,4751 | 0,7193 |
| TcCPX | | | | |
| Arequipa | 11,1326 | 4,7968 | 4,8381 | 28,6036 |
| Colombiana | 10,5267 | 3,6615 | 3,7029 | 13,0223 |
| CLBrener | 12,8120 | 4,9295 | 4,9709 | 31,3614 |
| TcMPX | | | | |
| Arequipa | 15,4953 | 0,4340 | 0,4718 | 1,3868 |
| Colombiana | 14,8285 | -0,6401 | -0,6024 | 0,6586 |
| CLBrener | 17,7665 | -0,0249 | 0,0127 | 1,0088 |
| TcSodA | | | | |
| Arequipa | 14,3147 | 1,6147 | 1,6932 | 3,2339 |
| Colombiana | 13,3251 | 0,8631 | 0,9417 | 1,9208 |
| CLBrener | 16,0801 | 1,6614 | 1,7400 | 3,3404 |
| TcSodB | | | | |
| Arequipa | 14,9325 | 0,9968 | 1,0384 | 2,0540 |
| Colombiana | 12,7426 | 1,4456 | 1,5049 | 2,8380 |
| CLBrener | 16,5523 | 1,1892 | 1,2453 | 2,3708 |
| TcTrS | | | | |
| Arequipa | 15,6457 | 0,2837 | 0,3429 | 1,2683 |
| Colombiana | 15,0678 | -0,8794 | -0,8202 | 0,5663 |
| CLBrener | 17,7838 | -0,0422 | 0,0170 | 1,0118 |
| TcTrR | | | | |
| Arequipa | 16,1216 | -0,1922 | -0,1361 | 0,9099 |
| Colombiana | 14,9216 | -0,7333 | -0,6772 | 0,6253 |
| CLBrener | 17,2354 | 0,5061 | 0,5622 | 1,4765 |

*Controle endógeno de quantificação TcP2a (gene de copia única de *T. cruzi*)

Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas no número de cópias dos genes TcMPX, TcSodA TcTrR e TcTrS entre as cepas Arequipa ($1,08 \pm 0,05$; $3,04 \pm 0,14$; $1,06 \pm 0,11$ e $1,09 \pm 0,06$; respectivamente), Colombiana ($0,98 \pm 0,09$; $3,05 \pm 0,14$; $0,88 \pm 0,09$; e $1,05 \pm 0,07$; respectivamente) e clone CL Brener ($1,04 \pm 0,03$; $3,06 \pm 0,17$; $1,04 \pm 0,13$ e $1,04 \pm 0,04$; respectivamente) (Fig. 35). Por outro lado, observou-se diferenças significativas (p

<0,05) no número de cópias do gene TcAPX na cepa Arequipa ($1,11 \pm 0,1$), quando foi comparado na cepa Colombiana ($0,63 \pm 0,15$) e no clone CL Brener ($0,85 \pm 0,08$); do gene TcCPX no clone CL Brener ($30,1 \pm 3,3$) quando foi comparado nas cepas Arequipa ($16,7 \pm 3,1$) e Colombiana ($16,4 \pm 2,6$) e do gene TcSodB na cepa Colombiana ($3,20 \pm 0,23$) e no clone CL Brener ($3,14 \pm 0,23$), quando foram comparados na cepa Arequipa ($2,50 \pm 0,26$) (Fig. 35). Assim como verificado nas análises *in silico*, os resultados *in vitro* mostraram uma diferença significativa ($p < 0,05$) no número de cópias do gene TcCPX, quando foi comparado com os outros genes antioxidantes; assim como também houve diferenças significativas ($p < 0,05$) no número de cópias dos genes TcSodA, TcSodB, quando foram comparados com os genes TcAPX, TcMPX, TcTrR e TcTrS, em cada uma das cepas e o clone de *T. cruzi* avaliadas individualmente neste estudo.

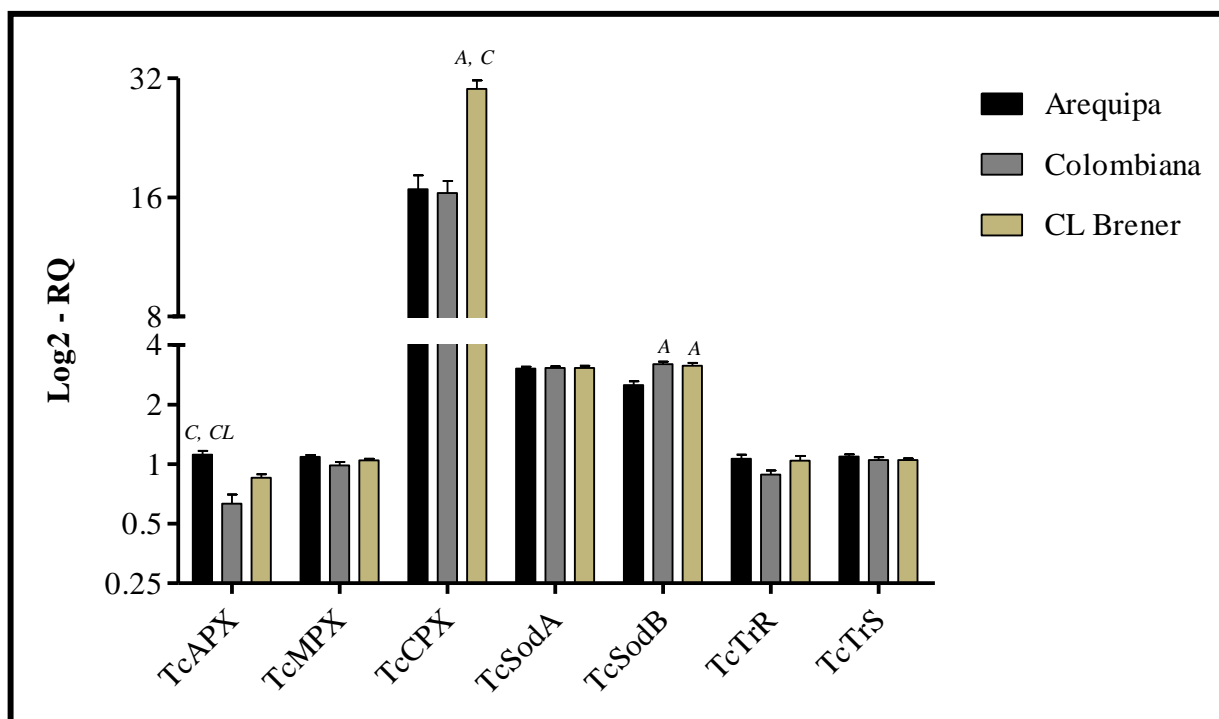


Figura 35: Avaliação do número de cópias de genes antioxidantes *in vitro*, nas cepas Arequipa, Colombiana e no clone CL Brener de *T. cruzi*. TcAPX (gene da ascorbato peroxidase), TcTrS (gene da triparedoxina sintetase), TcSodA (gene da superóxido dismutase A), TcCPX (gene da peroxiredoxina citosólica) e TcMPX (gene da peroxiredoxina mitocondrial). A: representa uma diferença significativa ($p < 0,05$) no número de cópias do gene antioxidante em relação a cepa Arequipa. C: representa uma diferença significativa ($p < 0,05$) no número de cópias do gene antioxidante em relação a cepa Colombiana.

5.1.5.2 Determinação dos níveis de expressão das enzimas antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*.

Os resultados do número de cópias dos genes antioxidantes tanto *in silico* como *in vitro* mostraram que não houve diferenças significativas, quando foram avaliados os genomas das cepas Arequipa, Colombiana e do clone CL Brener de *T. cruzi*. Nós visamos então determinar os níveis de expressão dos genes que codificam as enzimas antioxidantes, utilizando o método de quantificação relativa em tempo real (qPCR). Este tipo de quantificação determina a relação entre o número de moléculas em diferentes amostras considerando o ciclo de amplificação. Quanto menor o número de ciclos, maior o número de moléculas de cDNA produzidas e vice-versa. Dessa forma, a intensidade de fluorescência de cada amostra, que é proporcional a quantidade de cDNA, foi expresso pelo valor do ciclo do PCR tomado como base de análise o CT (Cycle Threshold). Como normalizador, foi utilizado o gene GADPH de *T. cruzi* que é um gene expresso de forma constitutiva pelo parasito. Foram também utilizados parasitos de sobrenadante de cultura de células L6 como controle para determinar o número de moléculas de cDNA dos genes antioxidantes expressos de forma não induzida pelo ambiente intracelular nos macrófagos. A expressão dos genes antioxidantes das cepas de *T. cruzi* foi avaliada considerando os tempos de incubação, entre 3 até 72 horas, após a infecção inicial.

A variação de expressão foi analisada pelo ciclo de *threshold* (Ct) da amplificação de cada gene antioxidante, o qual foi comparado com a amplificação do gene GADPH. 24 horas após a infecção inicial, houve a expressão diferencial do gene TcCPX entre as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*. Os Ct para o gene normalizador GADPH foi de $22,5 \pm 0,7$ e os Ct para o gene TcCPX foi de $21,9 \pm 0,5$; $18,9 \pm 0,6$ e $18,4 \pm 0,2$; para a cepa Arequipa, Colombiana e CLBrenner, respectivamente (Fig. 36A). Além disso, os produtos gênicos foram avaliados no final do processo da amplificação, verificando as curvas das temperaturas de dissociação (Tm) o *melting curve*, sendo assim os resultados mostraram, para o gene GADPH o Tm de 86,77 e para o gene TcCPX o Tm de 84,53 (Fig. 36B).

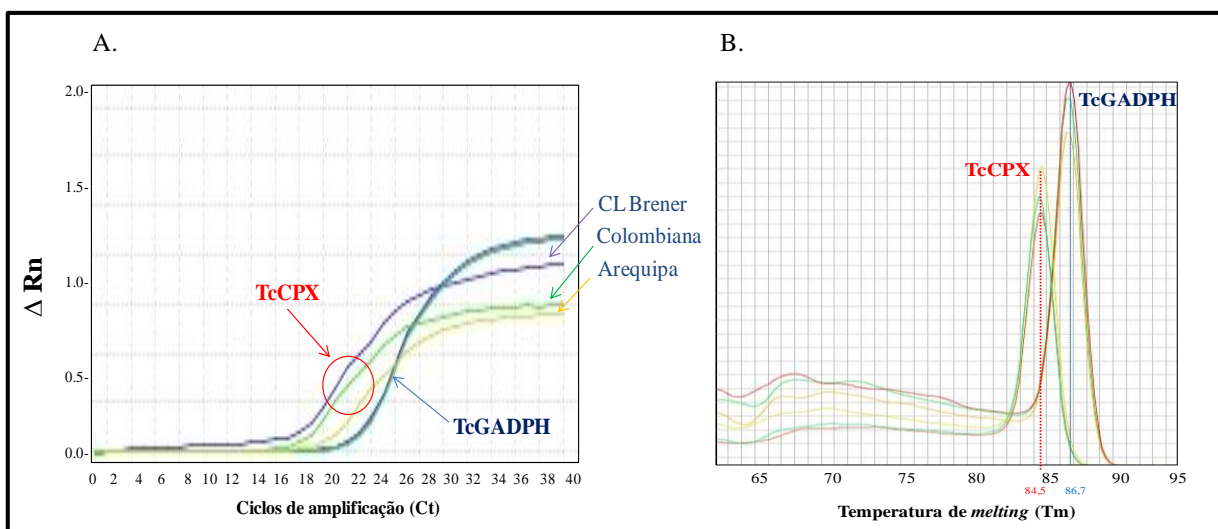


Figura 36: Avaliação dos níveis de expressão de genes antioxidantes 24 horas após a infecção inicial, por qPCR Real Time - Sybr Green. A) Ciclos de amplificação (Ct) do gene normalizador GADPH e do gene antioxidantes TcCPX das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*. **B)** Verificação das temperaturas de *melting* (Tm) do gene normalizador GADPH e do gene antioxidante TcCPX das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*.

Os resultados mostraram aumento na expressão dos genes antioxidantes as 3, 24, 48 e 72 horas após a infecção inicial, o qual foi dependente da linhagem de *T. cruzi* utilizada neste estudo. Observou-se também uma expressão diferencial em todos os genes antioxidantes quando foram comparados com os tripomastigotas livres obtidos do sobrenadante da cultura celular, o qual foi utilizado como controle dos níveis de expressão. Para o gene TcAPX, os resultados mostraram que 3 e 24 horas após a infecção inicial, não houve diferenças significativas entre as cepas e o clone de *T. cruzi*. Contrariamente, observou-se que 48 e 72 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão deste gene pelo clone CL Brener ($1,5 \pm 0,4$ e $4,5 \pm 2,7$; respectivamente), quando foi comparado com sua expressão nas cepas Arequipa ($0,9 \pm 0,3$ e $1,9 \pm 0,9$; respectivamente) e Colombiana ($0,8 \pm 0,4$ e $1,5 \pm 0,7$; respectivamente) (Fig. 37A). Para o gene TcCPX, os resultados mostraram que 3 horas após a infecção inicial, não houve diferenças significativas entre as cepas e o clone de *T. cruzi*. Contrariamente, observou-se que 24 e 48 após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão deste gene pelo clone CL Brener ($7,28 \pm 3,13$ e $9,28 \pm 3,63$, respectivamente), quando foi comparado com sua expressão nas cepas Arequipa ($2,98 \pm 1,18$ e $1,89 \pm 0,54$, respectivamente) e Colombiana ($2,26 \pm 1,17$ e $3,74 \pm 2,13$, respectivamente); assim também, 48 horas após a infecção inicial, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão deste gene pela cepa Colombiana, quando foi comparada

com sua expressão na cepa Arequipa. Do mesmo modo, os resultados mostraram que 72 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão deste gene pela cepa Arequipa ($5,77 \pm 1,89$) e pelo clone CL Brener ($5,48 \pm 2,52$) quando foram comparados com sua expressão na cepa Colombiana ($2,35 \pm 1,11$) (Fig. 37B). Para o gene TcMPX, os resultados mostraram que não houve diferenças significativas 24 e 72 horas após a infecção inicial, entre as cepas e o clone de *T. cruzi*. Contrariamente, observou-se que 3 horas após a infecção inicial, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão deste gene pela cepa Colombiana ($1,50 \pm 0,37$), quando foi comparado com sua expressão na cepa Arequipa ($0,52 \pm 0,15$). Do mesmo modo, os resultados mostraram que 48 horas após a infecção inicial, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão deste gene pelo clone CL Brener ($1,81 \pm 0,17$), quando foi comparado com sua expressão na cepa Arequipa ($0,62 \pm 0,17$) (Fig. 37C). Para o gene TcTrR, os resultados mostraram também, que não houve diferenças significativas 24 e 72 horas após a infecção inicial, entre as cepas e o clone de *T. cruzi*. Contrariamente, observou-se que 3 horas após a infecção inicial, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão deste gene pela cepa Colombiana ($1,27 \pm 0,31$), quando foi comparado com sua expressão na cepa Arequipa ($0,39 \pm 0,02$). Do mesmo modo, os resultados mostraram que 48 horas após a infecção inicial, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão deste gene pelo clone CL Brener ($2,27 \pm 0,28$), quando foi comparado com sua expressão na cepa Arequipa ($0,83 \pm 0,24$) (Fig. 37D). Para o gene TcTrS, os resultados mostraram que não houve diferenças significativas 24 horas após a infecção inicial, entre as cepas e o clone de *T. cruzi*. Contrariamente, observou-se que 3 horas após a infecção inicial, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão deste gene pela cepa Colombiana ($1,36 \pm 0,36$), quando foi comparado com sua expressão na cepa Arequipa ($0,51 \pm 0,05$); assim também, 48 horas após a infecção inicial, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão deste gene pelo clone CL Brener ($1,16 \pm 0,15$), quando foi comparado com sua expressão nas cepas Arequipa ($0,54 \pm 0,16$) e Colombiana ($0,38 \pm 0,11$). Do mesmo modo, os resultados mostraram que 72 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão deste gene pela cepa Arequipa ($1,05 \pm 0,33$) e pelo clone CL Brener ($1,20 \pm 0,20$) quando foram comparados com sua expressão na cepa Colombiana ($0,35 \pm 0,12$) (Fig. 37E). Para o gene TcSodA, os resultados mostraram que 3 horas após a infecção inicial, houve diferenças

significativas ($p < 0,05$) na expressão deste gene pela cepa Colombiana ($3,01 \pm 0,59$), quando foi comparada com sua expressão na cepa Arequipa ($1,35 \pm 0,49$) e no clone CL Brener ($1,14 \pm 0,07$); assim também, 24 e 48 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão deste gene pela cepa Colombiana ($4,95 \pm 0,73$ e $2,79 \pm 0,34$, respectivamente) e pelo clone CL Brener ($3,39 \pm 0,63$ e $2,24 \pm 0,37$, respectivamente), quando foram comparados com sua expressão na cepa Arequipa ($1,25 \pm 0,07$ e $0,92 \pm 0,11$, respectivamente). Do mesmo modo, os resultados mostraram que 72 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão deste gene pela cepa Arequipa ($4,81 \pm 0,68$), quando foi comparado com sua expressão na cepa Colombiana ($2,69 \pm 0,58$) e no clone CL Brener ($2,99 \pm 0,38$) (Fig. 37F). Finalmente, para o gene TcSodB, os resultados mostraram que não houve diferenças significativas 48 horas após a infecção inicial, entre as cepas e o clone de *T. cruzi*. Contrariamente, observou-se que 3 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão deste gene pela cepa Colombiana ($6,34 \pm 0,77$) quando foi comparado com sua expressão na cepa Arequipa ($2,10 \pm 0,54$) e no clone CL Brener ($2,14 \pm 0,26$); assim também 24 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão deste gene pela cepa Colombiana ($7,39 \pm 1,11$) e pelo clone CL Brener ($6,25 \pm 0,46$), quando foram comparados com sua expressão na cepa Arequipa ($2,57 \pm 0,25$). Do mesmo modo, os resultados mostraram que 72 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão deste gene pela cepa Arequipa ($5,02 \pm 0,45$) e pelo clone CL Brener ($5,19 \pm 0,23$) quando foram comparados com sua expressão na cepa Colombiana ($3,43 \pm 0,60$) (Fig. 37G).

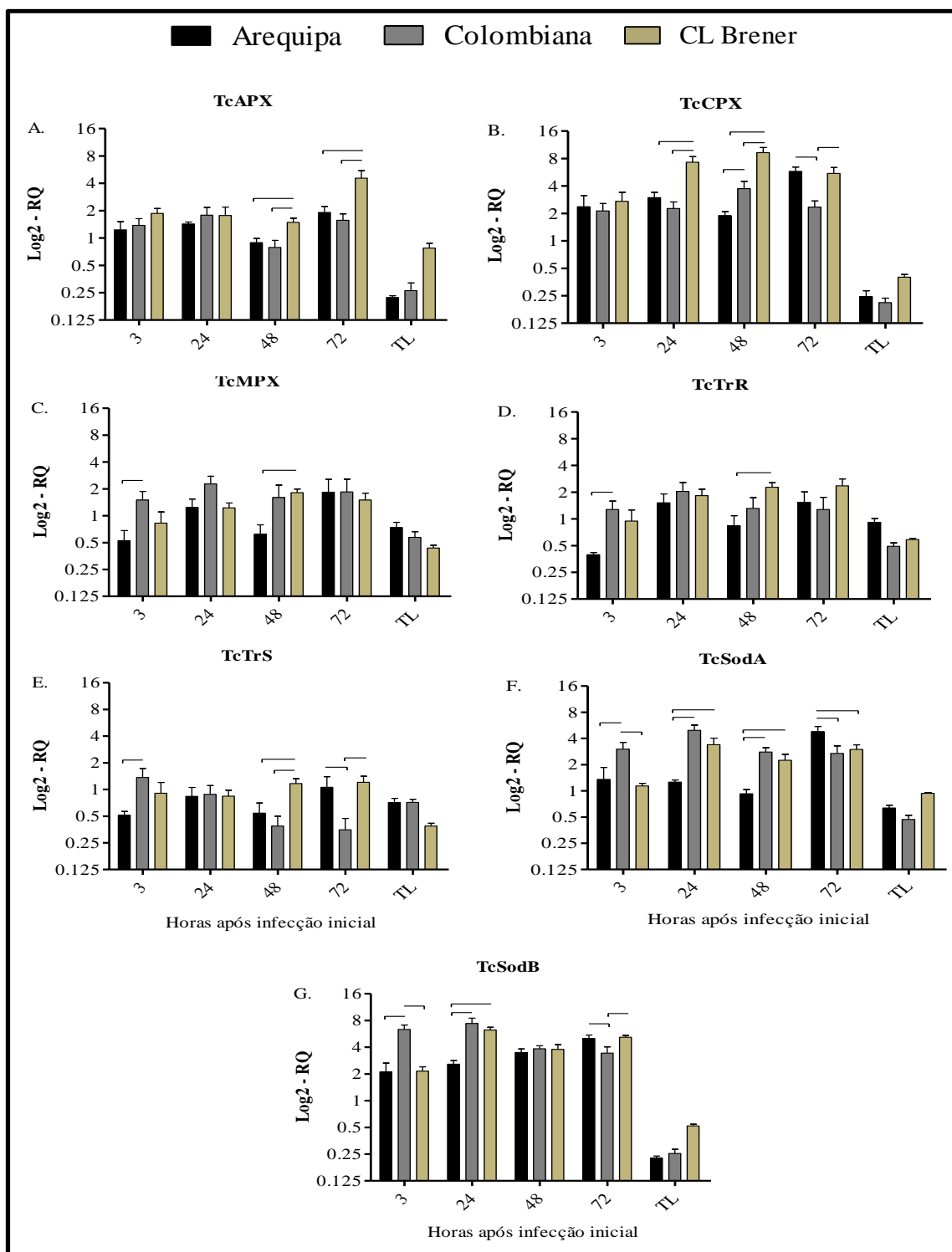


Figura 37: Expressão dos genes antioxidantes nas cepas Arequipa, Colombiana e no clone CL Brener de *T. cruzi*. A. Quantidade de moléculas de cDNA do gene TcAPX. B. Quantidade de moléculas de cDNA do gene TcCPX. C. Quantidade de moléculas de cDNA do gene TcMPX. D. Quantidade de moléculas de cDNA do gene TcTrR. E. Quantidade de moléculas de cDNA do gene TcTrS. F. Quantidade de moléculas de cDNA do gene TcSodA. G. Quantidade de moléculas de cDNA do gene TcSodB. TcAPX (gene Ascorbate Peroxidase), TcTrS (gene Triparedoxin Sintetase), TcSodA (gene Superóxido Dismutase A), TcCPX (gene Peroxiredoxin Citosólica) e TcMPX (gene Peroxiredoxin Mitocondrial). A linha conectora representa diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão do gene antioxidante entre as cepas e o clone de *T. cruzi* avaliados neste estudo.

Neste estudo, os níveis de expressão foram também avaliados comparando todos os genes antioxidantes entre si, individualmente, em cada tempo após a infecção inicial. No caso da cepa Arequipa, os resultados mostraram que 3, 24 e 48 horas após a infecção inicial, não houve diferenças significativas na expressão de cada um dos genes antioxidantes, avaliados neste estudo. Contrariamente, observou-se que 72 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão dos genes TcCPX ($5,77 \pm 0,67$), TcSodB ($5,02 \pm 0,45$) e TcSodA ($4,81 \pm 0,68$), quando foram comparados com a expressão dos genes TcAPX ($1,65 \pm 0,27$), TcMPX ($1,83 \pm 0,71$), TcTrR ($1,53 \pm 0,47$) e TcTrS ($1,05 \pm 0,33$). No caso da cepa Colombiana, os resultados mostraram que 48 e 72 horas após a infecção inicial, não houve diferenças significativas na expressão de cada um dos genes antioxidantes, avaliados neste estudo. Contrariamente, observou-se que 3 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão do gene TcSodB ($6,34 \pm 0,77$), quando foi comparado com a expressão dos genes TcAPX ($1,38 \pm 0,25$), TcCPX ($2,13 \pm 0,43$), TcMPX ($1,50 \pm 0,37$), TcTrR ($1,27 \pm 0,31$), TcTrS ($1,36 \pm 0,36$) e TcSodA ($3,01 \pm 0,59$). Do mesmo modo, os resultados mostraram que 24 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão dos genes TcSodA ($4,95 \pm 0,73$) e TcSodB ($7,39 \pm 1,11$), quando foram comparados com a expressão dos genes TcAPX ($1,78 \pm 0,39$), TcCPX ($2,26 \pm 0,41$), TcMPX ($2,27 \pm 0,49$), TcTrR ($2,04 \pm 0,52$) e TcTrS ($0,88 \pm 0,22$). No caso do clone CL Brener, os resultados mostraram que 3 horas após a infecção inicial, não houve diferenças significativas na expressão de cada um dos genes antioxidantes, avaliados neste estudo. Contrariamente, observou-se que 24 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão dos genes TcCPX ($7,28 \pm 1,11$) e TcSodB ($6,25 \pm 0,46$), quando foram comparados com a expressão dos genes TcAPX ($1,76 \pm 0,42$), TcMPX ($1,22 \pm 0,16$), TcTrR ($1,82 \pm 0,33$), TcTrS ($0,84 \pm 0,14$) e TcSodA ($3,39 \pm 0,63$). Do mesmo modo, os resultados mostraram que 48 horas após a infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão do gene TcCPX ($9,28 \pm 1,28$), quando foi comparado com a expressão dos genes TcAPX ($1,49 \pm 0,16$), TcMPX ($1,81 \pm 0,17$), TcTrR ($2,27 \pm 0,28$), TcTrS ($1,16 \pm 0,15$), TcSodA ($2,24 \pm 0,37$) e TcSodB ($3,78 \pm 0,51$). Finalmente, observou-se que 72 horas após a infecção inicial, também houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão dos genes TcAPX ($4,55 \pm 0,98$), TcCPX ($5,48 \pm 0,89$) e TcSodB ($5,19 \pm 0,23$), quando foram comparados com a expressão dos genes

TcMPX ($1,49 \pm 0,29$), TcTrR ($2,36 \pm 0,45$), TcTrS ($1,2 \pm 0,2$) e TcSodA ($2,99 \pm 0,38$). Os dados mostrados previamente foram analisados por *Heatmap*, para representação visual dos níveis de expressão dos genes antioxidantes, onde os valores individuais de expressão são representados colorimetricamente (Fig. 38).

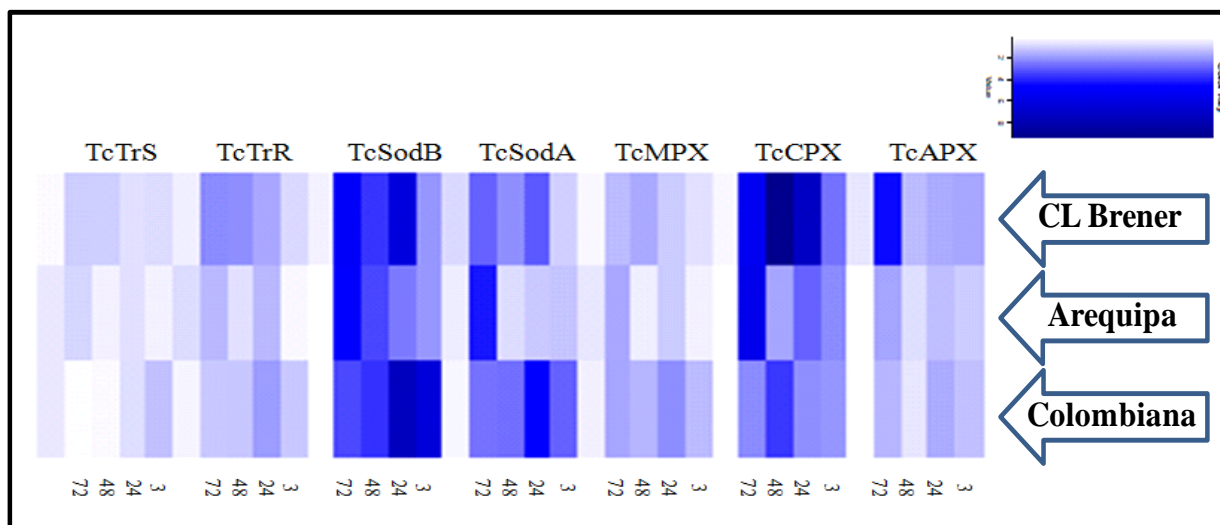


Figura 38: Análise por *Heatmap* da expressão dos genes antioxidantes nas cepas Arequipa, Colombiana e no clone CL Brener de *T. cruzi*. O esquema colorimétrico mostra uma dispersão do clone CL Brener o que significa que apresentou uma expressão diferencial quando foi comparada com as cepas Arequipa e Colombiana. A *color key* mostra um incremento na expressão em relação com a mudança de cor, uma maior intensidade da cor azul representa uma maior expressão do gene.

5.2 Tópico II

Após varias tentativas de infecção *in vivo* de camundongos C57BL6 com a cepa Arequipa de *T. cruzi*, nossos resultados sempre foram negativos. Neste sentido visamos realizar o processo de reativação, com a finalidade de obter uma maior capacidade infectante desta cepa. Para tanto, foi realizada a alimentação artificial do vetor *Triatoma infestans* no estágio ninfal 5, com sangue contendo epimastigotas e tripomastigotas de cultura numa concentração de 1×10^6 parasitos/ml. Após o seu desenvolvimento a adulto, foram obtidos os tripomastigotas metacíclicos do conteúdo intestinal do vetor. A cepa reativada (Arequipa-RE) foi utilizada para a cultura *in vitro*, infecção dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e avaliação da expressão de enzimas antioxidantes. Esta cepa também foi utilizada para a avaliação da infecção *in vivo* de camundongos C57BL/6.

5.2.1 Determinação dos níveis de expressão das enzimas antioxidantes da cepa Arequipa-RE de *T. cruzi*.

Para os genes TcAPX e TcCPX, os resultados mostraram que 24 e 48 horas após a infecção inicial, não houve diferenças significativas entre estas cepas de *T. cruzi*. Por outro lado, observou-se que 3 horas após a infecção inicial, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão destes genes pela cepa Arequipa-RE ($3,7 \pm 0,2$ e $4,69 \pm 0,28$; respectivamente), quando foram comparados com suas expressões na cepa Arequipa não infectante ($1,22 \pm 0,29$ e $2,36 \pm 0,77$; respectivamente); em contrapartida, 72 horas após a infecção inicial, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão destes genes pela cepa Arequipa não infectante ($1,65 \pm 0,27$ e $5,77 \pm 0,67$; respectivamente), quando foram comparados com suas expressões na cepa Arequipa-RE ($0,68 \pm 0,05$ e $1,60 \pm 0,19$; respectivamente) (Fig. 39A e 39B). Para o gene TcMPX, os resultados mostraram que não houve diferenças significativas 24 e 72 horas após a infecção inicial, entre estas cepas de *T. cruzi*. Por outro lado, observou-se que 3 e 48 horas após a infecção inicial, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão deste gene pela cepa Arequipa-RE ($2,57 \pm 0,24$ e $1,26 \pm 0,09$; respectivamente), quando foi comparado com sua expressão na cepa Arequipa não infectante ($0,52 \pm 0,15$ e $0,62 \pm 0,17$; respectivamente) (Fig. 39C). Para o gene TcTrR, os

resultados mostraram que não houve diferenças significativas 3, 24, 48 e 72 horas após a infecção inicial, entre estas cepas de *T. cruzi* (Fig. 39D). Para o gene TcTrS, os resultados mostraram que não houve diferenças significativas 24, 48 e 72 horas após a infecção inicial, entre as cepas de *T. cruzi*. Contrariamente, observou-se que 3 horas após a infecção inicial, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão deste gene pela cepa Arequipa-RE ($2,11 \pm 0,30$), quando foi comparado com sua expressão na cepa Arequipa não infectante ($0,51 \pm 0,05$) (Fig. 39E). Para os genes TcSodA e TcSodB, os resultados mostraram que 3, 24 e 48 horas após a infecção inicial, não houve diferenças significativas entre estas cepas de *T. cruzi*. Em contrapartida, observou-se que 72 horas após a infecção inicial, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão destes genes pela cepa Arequipa não infectante ($4,31 \pm 0,81$ e $5,02 \pm 0,45$; respectivamente), quando foram comparados com suas expressões na cepa Arequipa-RE ($1,71 \pm 0,05$ e $2,29 \pm 0,20$; respectivamente) (Fig. 39F e 39G).

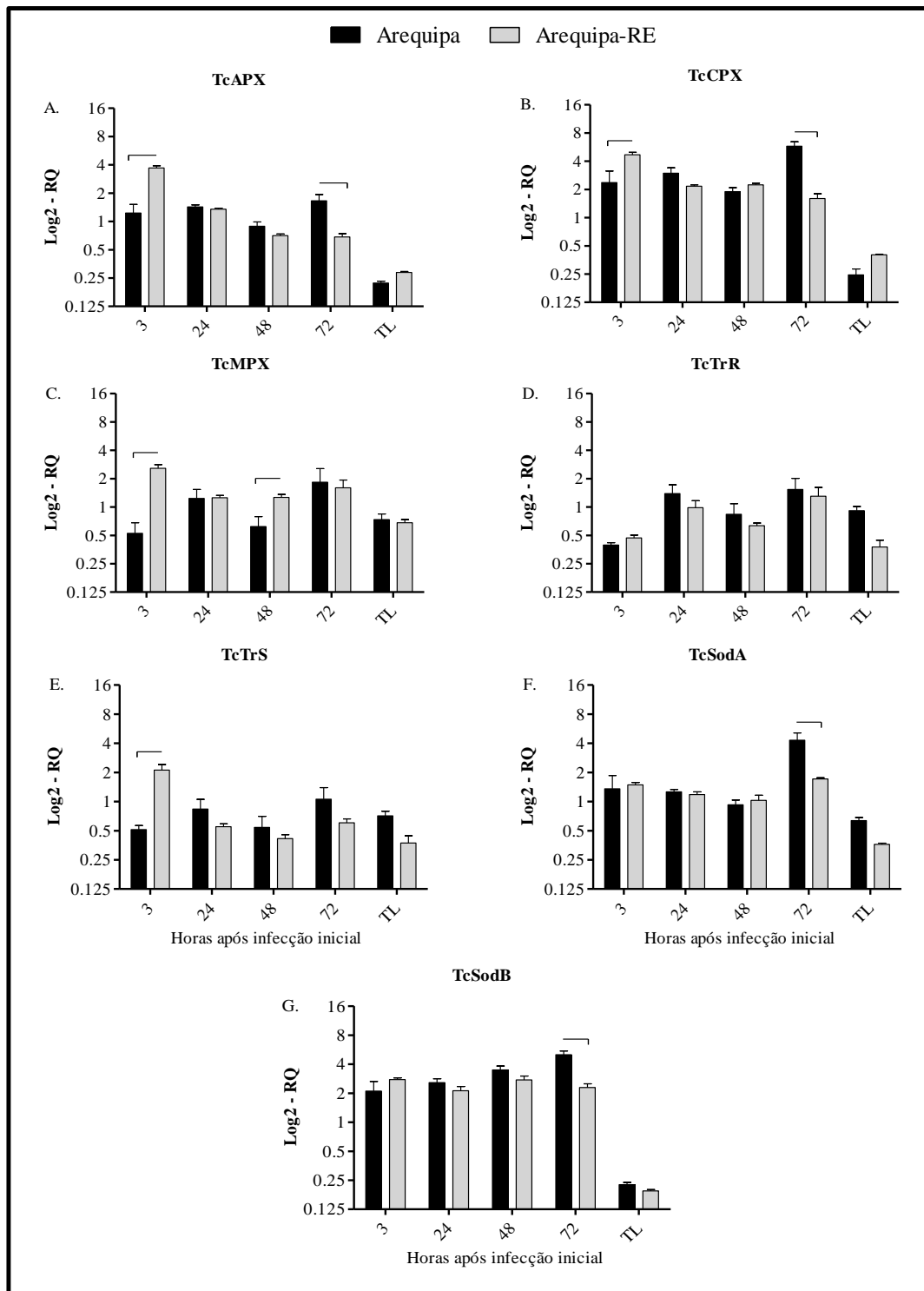


Figura 39: Expressão dos genes antioxidantes nas cepas Arequipa e Arequipa-RE de *T. cruzi*. A. Quantidade de moléculas de cDNA do gene TcAPX. B. Quantidade de moléculas de cDNA do gene TcCPX. C. Quantidade de moléculas de cDNA do gene TcMPX. D. Quantidade de moléculas de cDNA do gene TcTrR. E. Quantidade de moléculas de cDNA do gene TcTrS. F. Quantidade de moléculas de cDNA do gene TcSodA. G. Quantidade de moléculas de cDNA do gene TcSodB. TcAPX (gene Ascorbate Peroxidase), TcTrS (gene Triparedoxin Sintetase), TcSodA (gene Superóxido Dismutase A), TcCPX (gene Peroxiredoxin Citosólica) e TcMPX (gene Peroxiredoxin Mitocondrial). A linha conectora representa diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão do gene antioxidante entre as cepas Arequipa e Arequipa-RE de *T. cruzi*, avaliadas neste estudo.

5.2.2 Avaliação da parasitemia e sobrevivência de camundongos C57BL6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Camundongos C57BL/6 foram infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*. Estes animais foram divididos em cinco grupos experimentais e eutanasiados em diferentes tempos após infecção inicial (5, 15, 30, 60 e 120 dias). Além disto, foram utilizados cinco camundongos como grupo controle. A parasitemia destes animais foi avaliada desde o dia 5 pós-infecção inicial até a 4ª semana de infecção. Após este tempo, as leituras foram realizadas uma vez por semana. Camundongos infectados com a cepa Arequipa-RE, tiveram níveis de parasitemia detectáveis a partir do sétimo dia pós-infecção, com o pico da parasitemia no dia 21 pós-infecção. No caso de camundongos infectados com a cepa Colombiana, tiveram níveis de parasitemia detectáveis a partir do quinto dia pós-infecção, com um pico de parasitemia tardio no dia 27 pós-infecção. Por outro lado, camundongos infectados com o clone CL Brener, tiveram níveis de parasitemia detectáveis a partir do terceiro dia pós-infecção, com dois picos de parasitemia, o primeiro no dia 15 pós-infecção e o segundo no dia 21 pós-infecção.

Os resultados mostraram que nos dias 17 e 30 pós-infecção inicial, não houve diferenças significativas entre as cepas Arequipa-RE, Colombiana e o clone CL Brener. Contrariamente, observou-se que no dia 15 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na quantidade de parasitos/ μl em camundongos infectados com o clone CL Brener ($1410,3 \pm 210,5$), quando foi comparada com a quantidade de parasitos/ μl em camundongos infectados com as cepas Arequipa-RE ($443,2 \pm 35,26$) e Colombiana ($365,9 \pm 29,71$). No dia 21 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na quantidade de parasitos/ μl em camundongos infectados com a cepa Arequipa-RE ($1328,4 \pm 62,46$) e com o clone CL Brener ($2120,7 \pm 365,3$), quando foram comparadas com a quantidade de parasitos/ μl em camundongos infectados com a cepa Colombiana ($920,1 \pm 59,2$). Além disso, os resultados mostraram que no dia 27 pós-infecção inicial, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na quantidade de parasitos/ μl em camundongos infectados com a cepa Colombiana ($1376,2 \pm 121,8$), quando foi comparada com a quantidade de parasitos/ μl em camundongos infectados com o clone CL Brener ($814,3 \pm 162,8$) (Fig. 40A).

Após verificar a parasitemia, foi avaliada a sobrevivência dos camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e com o clone CL Brener de *T. cruzi*. Deste modo, observou-se que houve morte de 3 camundongos infectados com o clone CL Brener, nos dias 19, 21 e 25 pós-infecção inicial. Por outro lado, os camundongos infectados com as cepas Arequipa-RE e Colombiana tiveram uma sobrevivência de 100% (Fig. 40B).

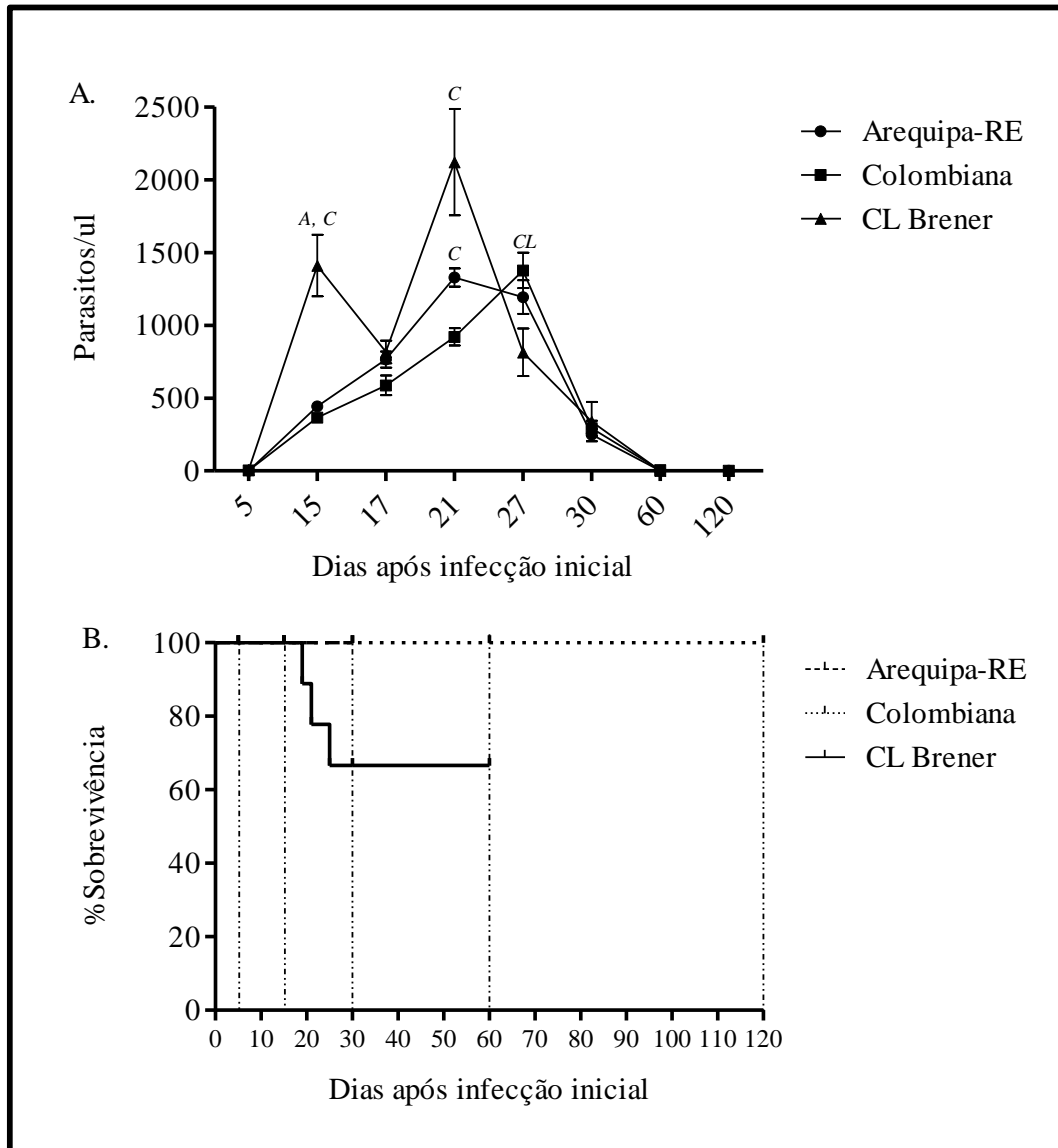


Figura 40: Análise da curva de parasitemia e percentual de sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*. A) Curva da parasitemia. B) Percentual de sobrevivência A: representa uma diferença significativa ($p < 0,05$) no número de parasitos/ μ l em relação à cepa Arequipa. C: representa uma diferença significativa ($p < 0,05$) no número de parasitos/ μ l em relação à cepa Colombiana. CL: representa uma diferença significativa ($p < 0,05$) no número de parasitos/ μ l em relação ao clone CL Brener.

5.2.3 Determinação da carga parasitária em tecido cardíaco, colón e músculo esquelético de camundongos C57BL6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Após a eutanásia dos camundongos C57BL6 infectados e dos controles, foram obtidos os órgãos para avaliação da carga parasitária tecidual. Os órgãos usados para a extração do DNA e avaliação da carga parasitária foram o coração, colón e músculo esquelético através da quantificação absoluta em tempo real (qPCR). Este tipo de quantificação determina o número de equivalente parasito por miligrama de tecido utilizado para a extração do DNA (N° Eq.-P/mg) em relação a uma curva padrão desenhada a partir do DNA obtido de uma quantidade conhecida de parasitos ($2,5 \times 10^5$) junto com uma quantidade exata de tecido (25 mg) que foram sequencialmente diluídos (1:10) até a mínima quantidade (1×10^0) do DNA detectado (Fig.41). Dessa forma o N° Eq.-P/mg foi determinado considerando o ciclo de amplificação. Quanto menor o número de ciclos, maior o número de Eq.-P/mg e vice-versa.

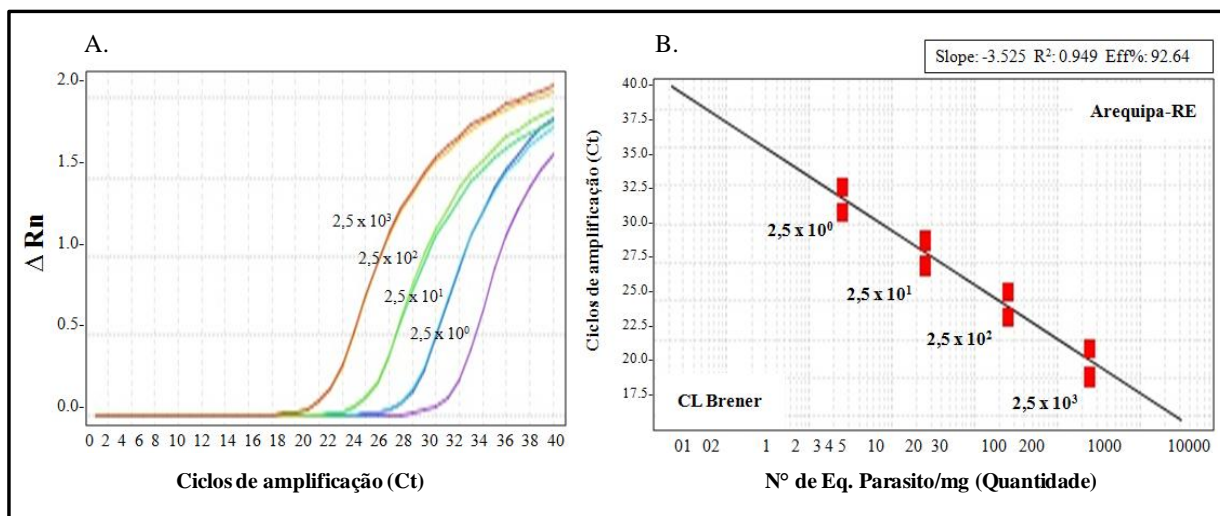


Figura 41: Avaliação da curva padrão para determinar a carga parasitária das cepas Arequipa-RE, Colombiana e do clone CL Brener, por qPCR Real Time - Taqman. A) Amplificação do gene alvo C1C2 em diluições (1:10) de $2,5 \times 10^3$ – $2,5 \times 10^0$ Eq-P/mg de tecido infectado com a cepa Arequipa-RE de *T. cruzi*. **B)** Avaliação da linealidade, confiabilidade e eficiência da amplificação do gene alvo C1C2 em diluições (1:10) de $2,5 \times 10^3$ – $2,5 \times 10^0$ Eq-P/mg da cepa Arequipa-RE e o clone CL Brener de *T. cruzi*.

Neste estudo de quantificação absoluta, os resultados mostraram que as cepas Arequipa-RE (Fig. 42A), Colombiana (Fig. 42B) e o clone CL Brener (Fig. 42C) de *T. cruzi* apresentam maior tropismo pelo tecido cardíaco, quando foram comparados individualmente com o tropismo pelo colón e músculo esquelético, embora cada cepa e o clone tenham diferente

capacidade proliferativa nestes órgãos. No caso do coração (Fig. 42D), os resultados mostraram que no dia 5, 15 e 30 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) no Eq-P/mg do clone CL Brener ($52,8 \pm 16,2$; $28037,8 \pm 4759,9$ e $8826 \pm 520,7$; respectivamente), quando foi comparado com o Eq-P/mg das cepas Arequipa-RE ($2,6 \pm 0,5$; $322,8 \pm 30,85$ e $829,3 \pm 157,5$; respectivamente) e Colombiana ($2,4 \pm 0,4$; $8532,8 \pm 1268,2$ e $6215,8 \pm 272,5$; respectivamente). Também, observou-se que no dia 15 e 30 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) no Eq-P/mg da cepa Colombiana, quando foi comparado com o Eq-P/mg da cepa Arequipa-RE. Do mesmo modo, os resultados mostraram também que no dia 60 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) no Eq-P/mg da cepa Colombiana ($281,6 \pm 16,1$) e do clone CL Brener ($331,4 \pm 48,1$) quando foram comparados com Eq-P/mg da cepa Arequipa-RE ($63,4 \pm 9,1$). Finalmente, observou-se que no dia 120 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) no Eq-P/mg da cepa Colombiana ($518,4 \pm 87,0$) quando foi comparado com Eq-P/mg da cepa Arequipa-RE ($49,3 \pm 17,3$).

A determinação da carga parasitária mostrou que as cepas Arequipa-RE e Colombiana apresentaram um maior tropismo pelo colón, quando foram comparadas individualmente com o tropismo pelo músculo esquelético (Fig. 42A e 42B). Contrariamente, observou-se que o clone CL Brener apresentou um maior tropismo pelo músculo esquelético, quando foi comparado individualmente com o tropismo pelo colón (Fig. 42C); embora cada cepa e o clone tenham diferente capacidade proliferativa nestes órgãos. No caso do colón (Fig. 42E) os resultados mostraram que no dia 5 pós-infecção inicial não houve detecção de Eq-P/mg das cepas Arequipa-RE, Colombiana e do clone CL Brener de *T. cruzi*. Contrariamente, observou-se que nos dias 15, 30 e 60 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) no Eq-P/mg da cepa Colombiana ($2671,6 \pm 888,1$; $651,7 \pm 44,1$ e $141,3 \pm 9,3$; respectivamente) e do clone CL Brener ($804,2 \pm 282,8$; $758,8 \pm 243,5$ e $173,3 \pm 11,3$; respectivamente) e quando foram comparados com Eq-P/mg da cepa Arequipa-RE ($76,0 \pm 28,4$; $125,0 \pm 20,4$ e $18,1 \pm 2,9$; respectivamente). Do mesmo modo, os resultados mostraram que no dia 120 pós-infecção inicial, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) no Eq-P/mg da cepa Colombiana ($158,2 \pm 14,2$) quando foi comparado com Eq-P/mg da cepa Arequipa-RE ($28,5 \pm 4,2$). No caso do músculo esquelético (Fig. 42F) os resultados mostraram que no dia 5 pós-infecção inicial não houve detecção de Eq-P/mg das cepas Arequipa-RE e Colombiana; em contrapartida, observou-se detecção de Eq-P/mg do clone CL Brener ($124,1 \pm 28,2$). Contrariamente,

observou-se que nos dias 15 e 30 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) no Eq-P/mg da cepa Colombiana ($700,2 \pm 111,5$ e $342,5 \pm 129,1$; respectivamente) e do clone CL Brener ($10202,9 \pm 1952,8$ e $3439,3 \pm 1281,6$; respectivamente), quando foram comparados com o Eq-P/mg da cepa Arequipa-RE ($36,3 \pm 9,4$ e $9,3 \pm 1,0$; respectivamente). Também observou-se que nos dias 15 e 30 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) no Eq-P/mg do clone CL Brener, quando foi comparado com o Eq-P/mg da cepa Colombiana. Do mesmo modo, os resultados mostraram que no dia 60 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) no Eq-P/mg da cepa Colombiana ($15,4 \pm 5,6$) e do clone CL Brener ($19,6 \pm 6,3$), quando foram comparados com Eq-P/mg da cepa Arequipa-RE ($2,3 \pm 0,9$). Finalmente, observou-se que no dia 120 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) no Eq-P/mg da cepa Colombiana ($115,5 \pm 16,4$) quando foi comparado com Eq-P/mg da cepa Arequipa-RE ($7,6 \pm 3,2$).

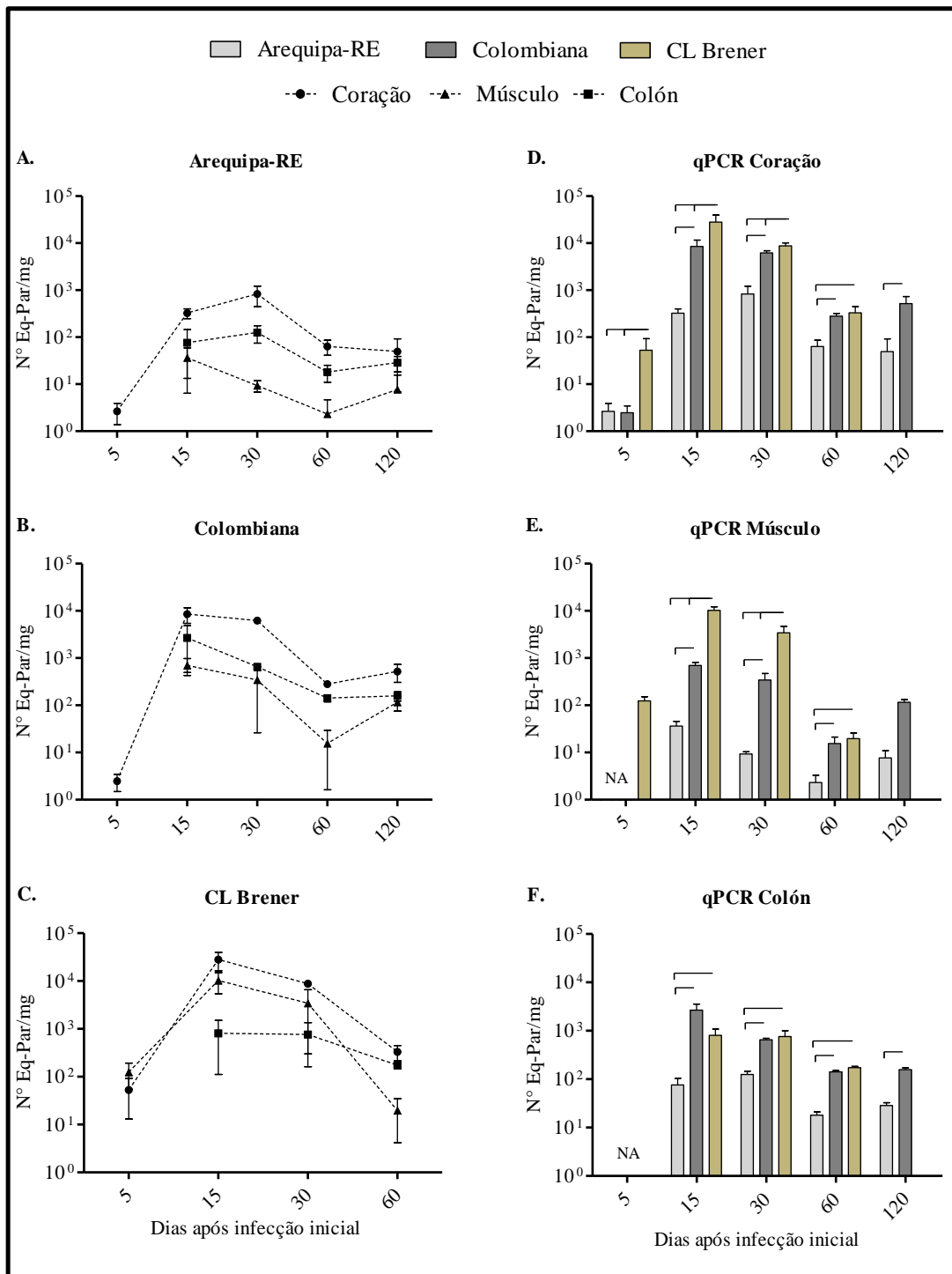


Figura 42: Quantificação da carga parasitária em coração, colón e músculo esquelético de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*. A. Quantidade de Eq-P/mg da cepa Arequipa-RE, no coração, colón e músculo esquelético. B. Quantidade de Eq-P/mg da cepa Colombiana, no coração, colón e músculo esquelético. C. Quantidade de Eq-P/mg do clone CL Brener, no coração, colón e músculo esquelético. D. Quantidade de Eq-P/mg das cepas Arequipa-RE, Colombiana e do clone CL Brener no coração. E. Quantidade de Eq-P/mg das cepas Arequipa-RE, Colombiana e do clone CL Brener no músculo esquelético. F. Quantidade de Eq-P/mg das cepas Arequipa-RE, Colombiana e do clone CL Brener no colón. A linha conectora representa diferença significativa ($p < 0,05$) na quantificação da carga parasitaria entre as cepas e o clone de *T. cruzi* avaliados neste estudo. NA: Não se aplica.

5.2.4 Determinação dos níveis de expressão de citocinas no tecido cardíaco de camundongos C57BL6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*

Os resultados da carga parasitária mostraram tropismo pelo tecido cardíaco em camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*, embora cada uma destas cepas tenha diferente capacidade proliferativa neste órgão. Neste sentido, foi avaliado a expressão de citocinas pró-inflamatórias (INF- γ , TNF- α e IL-12) e anti-inflamatória (IL-10), para estabelecer a existência de uma polarização da resposta imune, além da determinação da relação entre a quantidade de parasitos (N° Eq.P/mg) e a expressão de citocinas pró-inflamatórias que poderia gerar dano cardíaco na fase crônica da infecção no modelo murino. Os níveis de expressão foram analisados pelo ciclo de *threshold* (Ct) da amplificação de cada citocina a qual foi comparada com a amplificação da β -actina (controle endógeno). No dia 15 pós-infecção inicial, houve uma expressão diferencial de INF- γ entre as cepas Arequipa-RE, Colombiana e o clone CL Brener. O Ct para o gene normalizador β -actina foi de $15,76 \pm 0,93$ e o Ct do INF- γ para a cepa Arequipa-RE foi de $26,21 \pm 2,9$; para a cepa Colombiana foi de $22,88 \pm 1,37$ e para o clone CLBrenner foi de $20,41 \pm 1,21$ (Fig. 43A). Além disso, os produtos gênicos foram avaliados no final do processo da amplificação, verificando as curvas das temperaturas de dissociação (Tm) o *melting curve*, sendo assim os resultados mostraram, para a β -actina uma Tm de 81,91 e para o INF- γ um Tm de 82,55 (Fig. 43B).

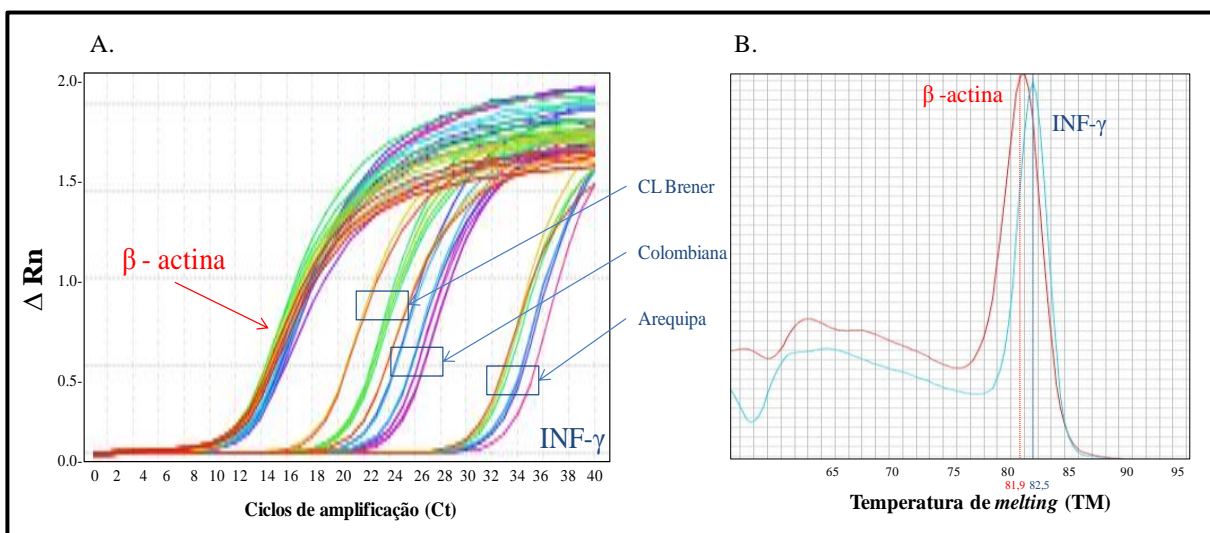


Figura 43: Avaliação dos níveis de expressão de INF- γ , no dia 15 pós-infecção inicial, por qPCR Real Time - Sybr Green. A) Ciclos de amplificação (Ct) do gene normalizador β -Actina e de INF- γ com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*. B) Verificação das temperaturas de *melting* (Tm) do gene normalizador β -Actina e de INF- γ .

Para o INF- γ , os resultados mostraram que no dia 120 pós-infecção inicial, não houve diferenças significativas com as cepas de *T. cruzi*. De maneira oposta, observou-se que no dia 5 pós-infecção inicial, houve aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na expressão desta citocina na infecção com a cepa Arequipa-RE ($1,43 \pm 0,49$), quando foi comparada com a cepa Colombiana ($0,22 \pm 0,04$) e com o clone CL Brener ($0,35 \pm 0,14$). Do mesmo modo, os resultados mostraram também que nos dias 15 e 60 pós-infecção inicial, houve aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão desta citocina com a cepa Colombiana ($107,8 \pm 13,85$ e $59,51 \pm 7,95$; respectivamente) e com o clone CL Brener ($175,1 \pm 29,98$ e $50,27 \pm 4,80$; respectivamente), quando foram comparadas com a cepa Arequipa-RE ($17,21 \pm 2,21$ e $25,38 \pm 1,59$; respectivamente); no entanto, observou-se que no dia 30 pós-infecção inicial, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão desta citocina apenas na infecção com o clone CL Brener ($88,11 \pm 5,35$), quando foi comparada com a cepa Arequipa-RE ($52,26 \pm 4,95$) (Fig. 44A). Para o TNF- α , os resultados mostraram que nos dias 5 e 15 pós-infecção inicial, não houve diferenças significativas com as cepas e com o clone de *T. cruzi*. De maneira oposta, observou-se que nos dias 30 e 60 pós-infecção inicial, houve aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na expressão desta citocina na infecção com a cepa Colombiana ($1,98 \pm 0,30$ e $0,88 \pm 0,10$; respectivamente) e com o clone CL Brener ($2,55 \pm 0,66$ e $1,21 \pm 0,18$; respectivamente), quando foram comparadas com a cepa Arequipa-RE ($1,09 \pm 0,13$ e $0,32 \pm$

0,04; respectivamente), assim também, observou-se que no dia 120 pós-infecção inicial, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão desta citocina com a cepa Colombiana ($0,60 \pm 0,08$) quando foi comparada com a cepa Arequipa-RE ($0,25 \pm 0,04$) (Fig.44B). Para a IL-12, os resultados mostraram que nos dias 15, 60 e 120 pós-infecção inicial, não houve diferenças significativas com as cepas e com o clone de *T. cruzi*. Inversamente, observou-se que no dia 5 pós-infecção inicial, houve aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na expressão desta citocina na infecção com a cepa Arequipa-RE ($2,07 \pm 0,41$), quando foi comparada com a cepa Colombiana ($0,50 \pm 0,12$) e com o clone CL Brener ($0,32 \pm 0,08$); assim também, observou-se que no dia 30 pós-infecção inicial, houve aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão desta citocina com a cepa Colombiana ($1,42 \pm 0,17$) e com o clone CL Brener ($1,40 \pm 0,06$), quando foram comparadas com a cepa Arequipa-RE ($0,83 \pm 0,08$) (Fig.44C). Para a IL-10, os resultados mostraram que nos dias 5 e 15 pós-infecção inicial, houve aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na expressão desta citocina na infecção com a cepa Arequipa-RE ($17,96 \pm 2,48$ e $35,83 \pm 2,62$; respectivamente), quando foi comparada com a cepa Colombiana ($3,17 \pm 0,86$ e $16,01 \pm 1,12$; respectivamente) e com o clone CL Brener ($4,51 \pm 0,80$ e $20,15 \pm 2,66$; respectivamente). Do mesmo modo, os resultados mostraram que nos dias 30 e 60 pós-infecção inicial, houve aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão desta citocina com a cepa Colombiana ($28,12 \pm 2,20$ e $43,77 \pm 6,77$; respectivamente) e o com o clone CL Brener ($30,90 \pm 1,40$ e $63,93 \pm 6,14$; respectivamente), quando foram comparadas com a cepa Arequipa-RE ($10,35 \pm 0,72$ e $8,75 \pm 1,05$; respectivamente). No dia 120 pós-infecção inicial, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão desta citocina com a cepa Colombiana ($37,80 \pm 8,13$), quando foi comparada com a cepa Arequipa-RE ($11,50 \pm 1,02$) (Fig.44D).

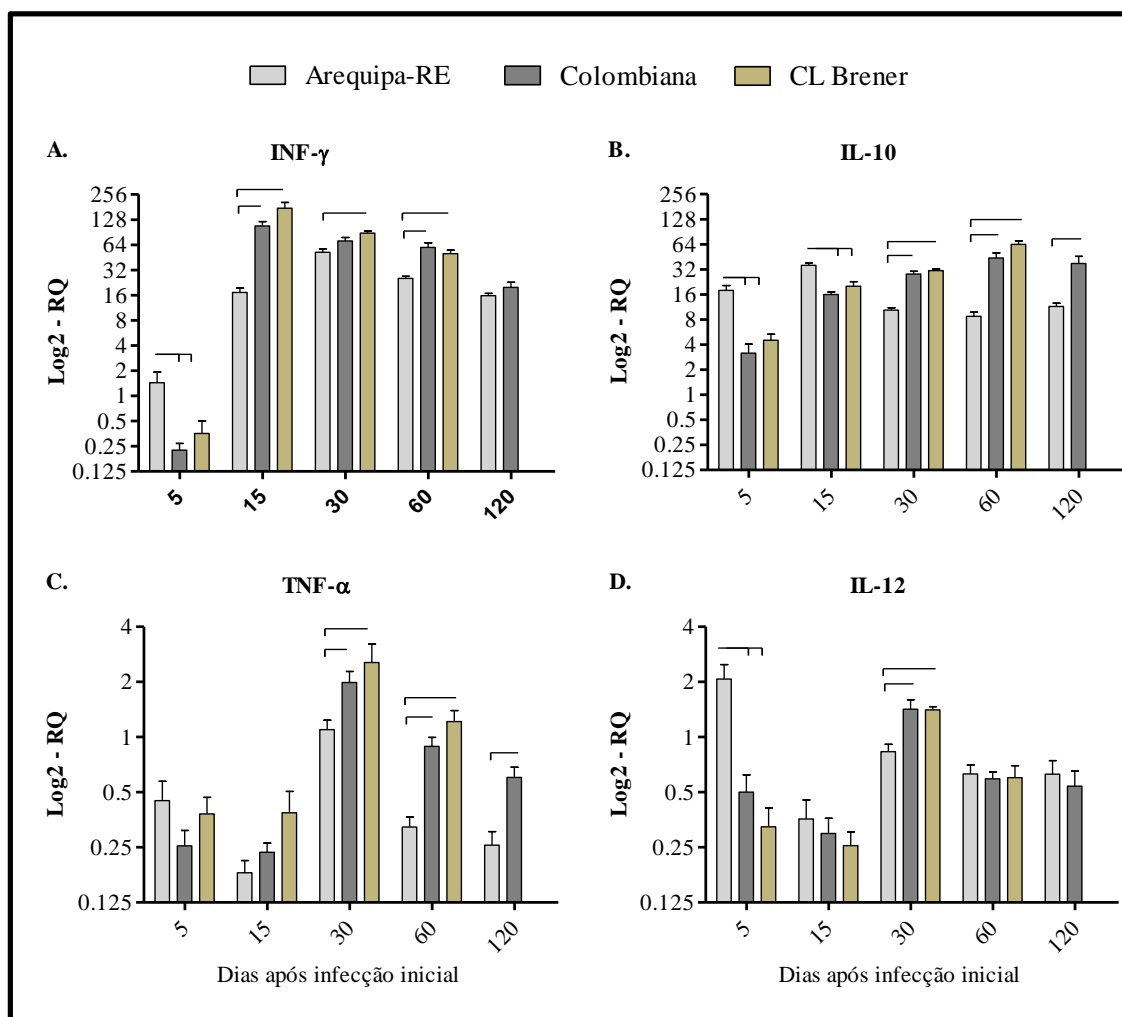


Figura 44: Expressão das citocinas no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*. A. Quantidade de moléculas de cDNA da citocina INF- γ . B. Quantidade de moléculas de cDNA da citocina IL-10. C. Quantidade de moléculas de cDNA da citocina TNF- α . D. Quantidade de moléculas de cDNA da citocina IL-12. A linha conectora representa diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão da citocina entre as cepas e o clone de *T. cruzi* avaliados neste estudo.

Neste estudo, o balanço dos níveis de expressão de citocinas no tecido cardíaco dos camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* foi também avaliado em todos os tempos pós-infecção inicial. No caso da cepa Arequipa-RE, os resultados mostraram que nos dias 5 e 15 pós-infecção inicial, houve aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na expressão de IL-10 ($17,96 \pm 2,48$ e $35,83 \pm 2,62$; respectivamente), quando foi comparada com a expressão de INF- γ ($1,43 \pm 0,49$ e $17,21 \pm 2,21$; respectivamente), IL-12 ($2,07 \pm 0,40$ e $0,35 \pm 0,09$; respectivamente) e TNF- α ($0,44 \pm 0,12$ e $0,18 \pm 0,03$; respectivamente). No dia 5 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão de INF- γ e IL-12, quando foram comparadas com a expressão de TNF- α

e no dia 15 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão de INF- γ , quando foi comparada com a expressão de TNF- α e IL-12. Em contrapartida, no dia 30 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão de INF- γ ($52,26 \pm 4,95$), quando foi comparada com a expressão de IL-10 ($10,35 \pm 0,72$), IL-12 ($0,83 \pm 0,07$) e TNF- α ($1,09 \pm 0,13$). Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão de IL-10, quando foi comparada com a expressão de TNF- α e IL-12. Do mesmo modo, os resultados mostraram que nos dias 60 e 120 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão de INF- γ ($25,38 \pm 1,59$ e $15,77 \pm 1,05$; respectivamente), quando foi comparada com a expressão de IL-10 ($8,75 \pm 1,05$ e $11,50 \pm 1,02$; respectivamente), TNF- α ($0,32 \pm 0,04$ e $0,25 \pm 0,04$; respectivamente) e IL-12 ($0,62 \pm 0,07$ e $0,62 \pm 0,11$; respectivamente); assim também, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão de IL-10, quando foi comparada com a expressão de TNF- α e IL-12 e também houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão de IL-12, quando foi comparada com a expressão de TNF- α . No caso da cepa Colombiana, os resultados mostraram que no dia 5 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão de IL-10 ($3,17 \pm 0,86$), quando foi comparada com a expressão de INF- γ ($0,22 \pm 0,04$), IL-12 ($0,50 \pm 0,12$) e TNF- α ($0,22 \pm 0,04$). Do mesmo modo, os resultados mostraram que nos dias 15, 30 e 60 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão de INF- γ ($107,8 \pm 13,85$; $71,21 \pm 7,06$ e $59,51 \pm 7,95$; respectivamente), quando foi comparada com a expressão de IL-10 ($16,01 \pm 1,12$; $28,12 \pm 2,20$ e $43,77 \pm 6,77$; respectivamente), IL-12 ($0,29 \pm 0,06$; $1,42 \pm 0,17$ e $0,59 \pm 0,05$; respectivamente) e TNF- α ($0,23 \pm 0,02$; $1,98 \pm 0,29$ e $0,88 \pm 0,10$; respectivamente); assim também, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão de IL-10, quando foi comparada com a expressão de IL-12 e TNF- α . Em contrapartida, observou-se que no dia 120 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão de IL-10 ($37,80 \pm 8,13$), quando foi comparada com a expressão de INF- γ ($19,88 \pm 2,88$), IL-12 ($0,53 \pm 0,11$) e TNF- α ($0,60 \pm 0,08$); assim também, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão de INF- γ , quando foi comparada com a expressão de IL-12 e TNF- α . No caso do clone CL Brener, os resultados mostraram que no dia 5 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão de IL-10 ($4,51 \pm 0,80$), quando foi comparada com a expressão de INF- γ ($0,35 \pm 0,14$), IL-12 ($0,32 \pm 0,08$) e TNF- α ($0,38 \pm 0,08$). Do mesmo modo, os resultados mostraram que nos dias 15 e 30 pós-

infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão de $\text{INF-}\gamma$ ($175,15 \pm 29,98$ e $88,11 \pm 5,35$; respectivamente), quando foi comparada com a expressão de IL-10 ($20,15 \pm 2,66$ e $30,90 \pm 1,40$; respectivamente), IL-12 ($0,25 \pm 0,04$ e $1,40 \pm 0,05$; respectivamente) e $\text{TNF-}\alpha$ ($0,38 \pm 0,11$ e $2,55 \pm 0,66$; respectivamente). Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão de IL-10 , quando foi comparada com a expressão de IL-12 e $\text{TNF-}\alpha$. Em contrapartida, observou-se que no dia 60 pós-infecção inicial, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão de $\text{INF-}\gamma$ ($50,27 \pm 4,80$) e IL-10 ($63,93 \pm 6,14$), quando foram comparadas com a expressão de $\text{TNF-}\alpha$ ($1,21 \pm 0,18$) e IL-12 ($0,59 \pm 0,09$). Os dados analisados e mostrados previamente foram utilizados para uma representação visual dos níveis de expressão das citocinas produzidas por camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e o clone CL Brener, onde os valores individuais de expressão são representados colorimetricamente (Fig. 45).

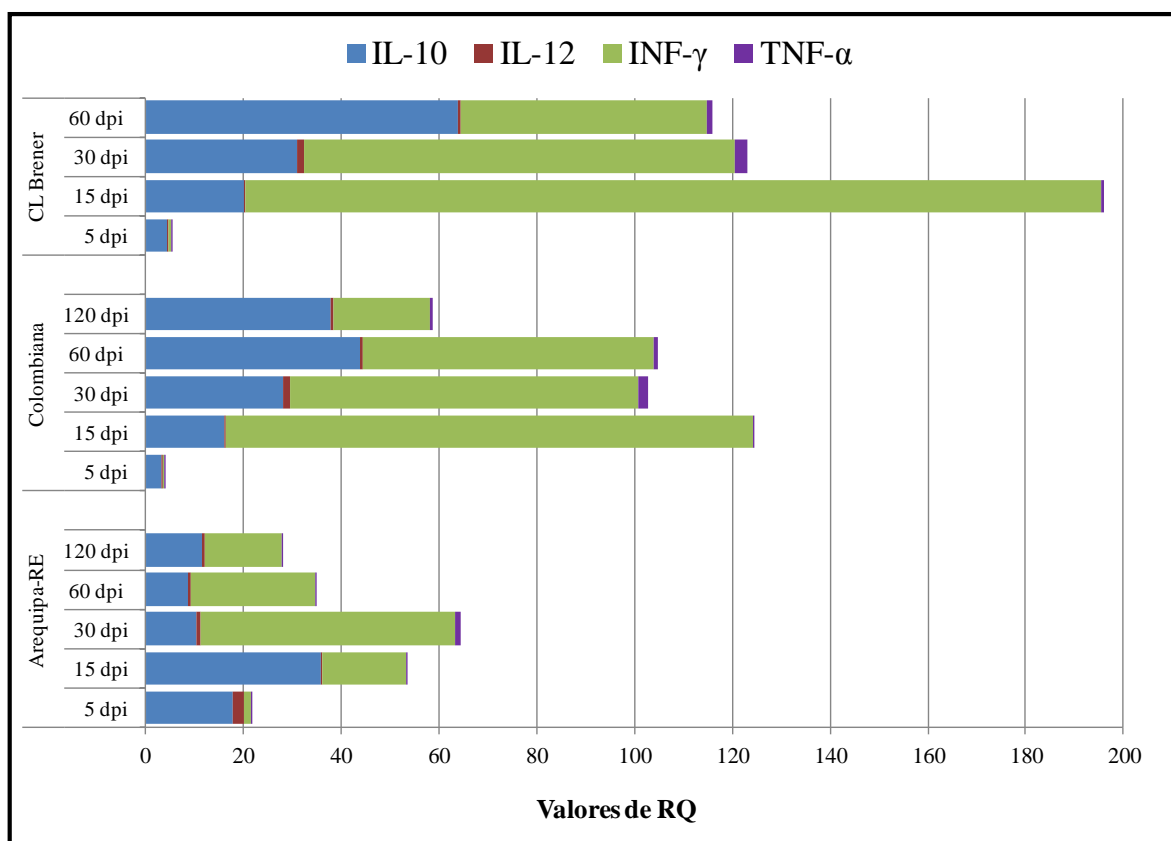


Figura 45: Análise esquemática da expressão de citocinas no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*, nos dias 5, 15, 30, 60 e 120 pós-infecção inicial. IL-10 (Interleucina 10), IL-12 (Interleucina 12), $\text{INF-}\gamma$ (Interferon gama) e $\text{TNF-}\alpha$ (Fator de necrose tumoral alfa).

6 DISCUSSÃO

Tópico I:

Trypanosoma cruzi é um parasito complexo e heterogêneo, incluindo um amplo grupo de cepas com uma variação intraespecífica que vem sendo documentada pela caracterização biológica e molecular, morfologia de formas sanguíneas, capacidade infectante, patogenicidade, sensibilidade a drogas, perfil antigênico, taxa de crescimento, metaciclogênese e tropismo por determinados tecidos (Murta e Romanha, 1999; Macedo *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2006). Uma das cepas de *T. cruzi* é um isolado da cidade de Arequipa, região endêmica da doença de Chagas no Peru, onde o principal vetor transmissor da doença é o *Triatoma infestans* (Monge 1914 e Escomel 1917). Estudos feitos por Cabrera (2008), relataram que mais do 80% dos casos de doença Chagas no Peru provém desta área geográfica. Esta cepa apresenta características próprias, como a baixa reatividade frente a métodos de diagnóstico convencionais e menor frequência de sinais clínicos na fase aguda da doença, quando comparada com outras cepas de diferentes regiões geográficas. Trabalhos de Mendoza *et al.*, (2005) mostraram uma prevalência de anticorpos de 0,73% em recém-nascidos de mães chagásicas e até 10,25% na população adulta. Esta prevalência é muito baixa comparada com a Bolívia, onde se mostrou uma prevalência de 29% de mulheres grávidas infectadas com este parasito (Bern *et al.*, 2009). A baixa reatividade do soro de pacientes Chagásicos infectados com a cepa Arequipa nos testes sorológicos pode estar associada a uma baixa virulência, infectividade e patogenicidade da mesma. De fato, no Peru, 95% dos casos de doença de Chagas são assintomáticos, sendo a manifestação mais frequente a febre que muitas vezes é confundida com outras doenças como Malária (Cabrera *et al.*, 2009). Polimorfismos em genes associados à virulência do parasito podem contribuir para diferentes perfis de patogenicidade entre isolados. Neste sentido, estudos de Anaya (1994) e Breniere (1985) mostraram que a maioria das cepas desta região pertence à DTU TcI, que em geral apresenta menor capacidade infectante e patogênica que algumas outras DTUs. De fato, estudos realizados por Yoshida, 2006 mostraram uma baixa infectividade *in vitro* e *in vivo* de parasitos do grupo DTU I, enquanto que parasitos do grupo DTU VI foram altamente infectantes. A fim de verificar a qual DTU a cepa Arequipa pertence, no presente trabalho, realizamos a caracterização genotípica deste usando o protocolo de D'Avila *et al.*, (2009). Este protocolo permite a separação de isolados de *T. cruzi* nas seis DTUs reconhecidas atualmente (Zingales *et al.*, 2009), através do

uso combinado de três marcadores genéticos: gene COII (Mantilla *et al.*, 2009), a região intergênica do gene Mini-exon (SL-IR) do *T. cruzi* (Burgos *et al.*, 2007), rDNA 24Sα (LSUrDNA) (Souto *et al.*, 1996). Desta forma foi realizada a caracterização genotípica do isolado de *T. cruzi* proveniente da localidade de “La Joya”, região situada ao Oeste da cidade de Arequipa, Peru, como sendo um representante da DTU I.

Após a caracterização genotípica da cepa Arequipa, avaliamos a capacidade infectante e a defesa antioxidante da cepa Arequipa em uma perspectiva comparativa com a cepa Colombiana e o clone CL Brener. Assim como a cepa Arequipa, Colombiana pertence à DTU TcI, porém diferentes de outras cepas deste grupo, apresenta alta virulência em infecção experimental (Talvani *et al.*, 2000 e Michailowsky *et al.*, 2004). O clone CL Brener pertencente à DTU VI, que é representada por isolados híbridos, também é considerada virulenta (Yoshida, 2006).

Segundo os estudos de Araújo-Jorge (1992) e de Burleigh e Andrews, (1995a) as formas tripomastigotas de *T. cruzi* têm a capacidade de invadir e proliferar em qualquer linhagem celular de mamífero mantida em cultura. A este respeito, Kipnis *et al.*, (1979) mencionaram que durante a interação do parasito com macrófagos, *in vitro*, o parasito sofre um processo ativo de fagocitose, e pode também induzir uma entrada ativa. Com estas premissas, nós realizamos a infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais obtidos a partir de camundongos BALB/c e avaliamos o percentual de fagocitose, o índice de internalização (Ii) que representa o número de amastigotas/100Mφ e o percentual de macrófagos infectados (PMI), além da taxa de infecção (TI) e multiplicação (TM) do parasito no interior destes macrófagos.

Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas na fagocitose, no Ii e no PMI, quando avaliado 3 horas após a infecção inicial, entre as cepas Arequipa, Colombiana e o clone CL Brener de *T. cruzi* (Fig. 14C, 15A e B). Esses resultados indicam que as três cepas de *T. cruzi* analisadas neste trabalho têm a mesma capacidade invasiva em macrófagos. Como as cepas analisadas neste trabalho são mais distantes filogeneticamente entre si (TcVI versus TcI) quando comparado com outras linhagens de *T. cruzi*, nós especulamos que os macrófagos peritoneais têm uma alta capacidade fagocítica que é independente do tipo genético das cepas de *T. cruzi*. Resultados similares foram descritos previamente por De Carvalho e De Souza, (1989) e por Milder e Kloetzel (1980), os quais relataram em estudos de microscopia eletrônica que tanto tripomastigotas como epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram eficientemente

internalizados por macrófagos peritoneais. Entretanto, qualquer afirmação mais assertiva sobre este aspecto necessita que se analise um número maior de cepas pertencentes a diferentes linhagens. Apesar de após três horas, não termos observado diferenças significativas quanto aos parâmetros usados na avaliação de invasão de macrófagos pelas três cepas, os resultados mostraram diferenças significativas no Ii 24 horas após a infecção inicial entre a cepa Colombiana e o clone CL Brener; assim como 48 e 72 horas após a infecção inicial entre a cepa Colombiana e Arequipa (Fig. 15A). No caso do PMI, foram observadas diferenças significativas 24, 48 e 72 horas após a infecção inicial no clone CL Brener, quando comparada com as cepas Arequipa e Colombiana (Fig. 15B). Finalmente, foi verificada a correlação entre Ii e PMI e os resultados mostraram correlação significativa durante a infecção de macrófagos pelas cepas Arequipa, Colombiana e pelo clone CL Brener, mostrando dessa forma que a quantidade de parasitos aumenta em relação à quantidade de células infectadas (Fig. 16A, B e C).

Com estes resultados foi demonstrado que o clone CL Brener caracterizada como DTU VI tem a maior taxa de infecção (TI) (Fig. 17A) e maior taxa de multiplicação (TM) (Fig. 17B), quando comparada com as cepas Arequipa e Colombiana caracterizadas como DTU I. Além disso, foram observadas diferenças significativas na TI, 48 e 72 horas após a infecção inicial entre a cepa Arequipa e o clone CL Brener e diferenças significativas na TM nos períodos de 3 - 48 horas e de 3 - 72 horas também entre a cepa Arequipa e o clone CL Brener. Juntos, estes resultados demonstraram uma maior capacidade infectiva e proliferativa do clone CL Brener quando comparada com a cepa Arequipa (Fig. 17A e B). Trabalhos similares de avaliação dos processos invasivos, como de Yoshida, (2006), corroboraram a baixa infectividade *in vitro*, de parasitos do grupo DTU TcI como a cepa G, enquanto que parasitos do grupo DTU TcVI como CL Brener, foram altamente infectantes.

Em nosso trabalho, os resultados da manutenção e do aumento progressivo do número médio de amastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi* sugerem que os macrófagos não foram capazes de inibir o crescimento ou destruir o parasito de forma a eliminar a infecção. Dados semelhantes foram relatados por Alcantara e Brener (1978) ao estudar a interação das cepas Y e CL com macrófagos peritoneais, sugerindo que a destruição de formas intracelulares de *T. cruzi* não ocorria em macrófagos não ativados. Além disso, estudo de dinâmica populacional de *T. cruzi* feito por Doyle e Dvorak, (1984), utilizando simulação computacional baseado em

modelos matemáticos, sugerem que cepas que apresentam uma maior taxa de multiplicação são favorecidas nas condições de cultura *in vitro*, tornando-se predominantes, mesmo estando em menor quantidade. Por outro lado, ensaios de inibição da replicação parasitária de nosso grupo de pesquisa, mostraram que a ativação de macrófagos peritoneais com INF- γ inibe o crescimento da cepa Arequipa de *T. cruzi*. Além disso, os resultados de infecção com esta cepa mostraram uma redução no número de parasitos, mesmo quando os macrófagos não foram estimulados com INF- γ (dados não mostrados). Os resultados da inibição do INF- γ , já foram relatados em vários trabalhos de infecção *in vitro* por Reed *et al.*, (1987); Plata *et al* (1987), Wirth *et al* (1985) e em trabalhos de infecção experimental *in vivo*, por Torrico *et al.*, (1991) e Silva *et al.*, (1995), onde mostraram que o INF- γ está associado com a defesa do hospedeiro, diminuindo a replicação parasitária.

Considerando que os macrófagos são células fagocíticas do sistema imune inato e que no estado ativado controlam a proliferação de parasitos intracelulares como *T. cruzi*, bem como sua disseminação no organismo (Belosevic *et al.*, 1988), neste trabalho foi avaliada a ativação dos macrófagos peritoneais após a infecção com as cepas Arequipa, Colombiana e o clone CL Brener de *T. cruzi*. Para tanto, foi avaliado o percentual de macrófagos expressando as moléculas MHC-II (Complexo Principal de Histocompatibilidade II) (Fig. 18 e 19) e CD80 (Molécula coestimuladora ou B7.1) (Fig. 20 e 21). Os resultados mostraram aumento da expressão destas duas moléculas em macrófagos peritoneais, independente da cepa de *T. cruzi* utilizada na infecção. Trabalhos relacionados com o reconhecimento antigênico, como de Felonato *et al.*, (2010), mostraram a expressão induzida das moléculas co-estimulatórias CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) na superfície de macrófagos, sendo importantes para que ocorra a completa ativação de linfócitos, a qual foi iniciada no momento da apresentação de antígenos por moléculas do MHC II, presentes em células apresentadoras de antígeno. Da mesma forma, Guermonprez *et al.*, (2002) mostraram que a exposição dos macrófagos a estímulos inflamatórios, tais como os componentes de membrana derivados de patógenos (parasitos), aumenta a expressão das moléculas MHC II. Por outro lado, Collins *et. al.*, (2005), mostraram que as moléculas MHCII, CD80 e CD86 estão envolvidas na função de apresentação de antígeno dos macrófagos e também podem caracterizar o seu estado de ativação. Em relação ao estado de ativação dos macrófagos, Cassado *et. al.*, (2011) demonstraram que populações de macrófagos caracterizadas como macrófagos pequenos apresentaram expressão de altos níveis

de MHC-II e baixos níveis de CD80, enquanto macrófagos grandes não apresentaram níveis significativos de MHC-II, mas apresentaram maior expressão de CD80. Desta forma, os resultados de ativação de macrófagos peritoneais, após a infecção com as cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener, mostraram que estas células possuem capacidade fagocítica e de ativação independente do tipo de cepa de *T. cruzi* utilizada durante a infecção.

T. cruzi pode sobreviver e evadir-se do ambiente altamente oxidativo presente nos macrófagos, conseguindo estabelecer a infecção (Piacenza *et al.*, 2009). Com a finalidade de investigar a capacidade do macrófago em eliminar estes parasitos, neste trabalho foi avaliado a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos após a fagocitose de tripomastigotas das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*. Diferentes estudos como de Horta *et al.*, (2012); Charmoy *et al.*, (2007); Nathan e Shiloh, (2000) mostraram que o processo de fagocitose induz a produção de NO pela ativação da enzima NO sintetase induzida e que esta produção de NO conseqüentemente causa a morte dos parasitos. Do mesmo modo Gazzinelli *et al.*, (1992) e Ameisen *et al.*, (1995) mostraram que altos níveis de NO têm efeitos antiparasitários *in vitro* e *in vivo*, participando nos mecanismos de defesa do hospedeiro. Por outro lado, Peluffo *et al.*, (2004) mostraram, *in vitro*, que macrófagos não ativados e invadidos por *T. cruzi* produzem uma pequena quantidade de NO que favorece a proliferação do parasito, possivelmente pela ação da via de sinalização através do guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Nossos resultados mostraram uma maior produção de NO por macrófagos infectados com a cepa Arequipa, o qual foi significativo quando comparado com o clone CL Brener (Fig. 23A). Estes resultados foram concordantes com diminuição da TM da cepa Arequipa em relação ao clone CL Brener nos tempos 3-48 e 3-72 horas após a infecção inicial (Fig. 17B). Como mencionado por Peluffo *et al.*, (2004), a menor produção de NO pode favorecer a multiplicação de *T. cruzi* no interior dos macrófagos peritoneais. Nossos dados corroboram com os trabalhos de Silva *et al.*, (2003) e de Petray *et al.*, (1994), os quais mostraram que os efeitos tóxicos do NO estão relacionados a uma menor taxa de multiplicação e infecção do *T. cruzi*. Inclusive, ensaios de infecção por Koo *et al.*, (2016), mostraram que cepas patogênicas de *T. cruzi* promoveram uma diminuição dos níveis de NO e que cepas não patogênicas promoveram um aumento de até duas vezes maiores na produção de NO.

Espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ter atividade antiparasitária por afetar vários processos biológicos de *T. cruzi* como a peroxidação lipídica ou causar lesão da

membrana celular ou mesmo modificações estruturais do DNA (Lewis *et al.*, 1986). Neste sentido, neste trabalho foi avaliado a produção de EROs por macrófagos após fagocitose de tripomastigotas de *T. cruzi*. Estudos como de Chang (1981); Pearson e Steigbigel (1981), mostraram que EROs estão relacionados com o papel funcional/protetor de macrófagos frente à infecção por *T. cruzi*. Outros trabalhos como de Mallinson *et al.*, (1989) e Blos *et al.*, (2003) mostraram que a fagocitose também induz a produção de EROs pela ativação da enzima NADPH oxidase e que esta produção é importante para a morte dos parasitos. No entanto, ao contrário dos estudos citados acima, Goes *et. al.*, (2016); Paiva *et al.*, (2012) e Paiva. *et al.*, (2014), mostraram evidências de que a produção de EROs não interferiria na sobrevivência de tripomastigotas de *T. cruzi* no interior destes macrófagos. Nossos resultados mostraram um aumento do percentual de EROs independente da cepa de *T. cruzi* utilizada na infecção de macrófagos peritoneais. Apesar das diferenças na produção de EROs não terem sido estatisticamente significativas, observou-se um maior percentual na produção de EROs por macrófagos infectados com a cepa Arequipa de *T. cruzi* (Fig. 23B). Dessa forma, a partir destes dados, sugerimos que a produção de EROs possa ter efeitos negativos na sobrevivência e multiplicação destes parasitos no interior dos macrófagos. Os resultados de correlação da capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais e consequente produção de NO (Fig. 24A, B, C) e EROs (Fig. 24D, E, F) parece demonstrar o papel protetor destas moléculas oxidativas, embora o parasito tenha a capacidade de sobreviver e evadir o ambiente altamente nitrooxidativo presente nos macrófagos peritoneais, tal como mencionaram os resultados de Piacenza *et al.*, (2009).

Vários estudos incluindo aqueles de Aliberti *et al.*, 1996 e Thomson *et al.*, 1998 demonstraram que *T. cruzi* tem um repertório de defesas bioquímicas, destacando-se a ação de peroxidases sobre radicais livres como NO e EROs. As peroxidases formam parte de um grupo de enzimas antioxidantes e a este respeito, trabalhos como os de Irigoín *et al.*, (2008), Piacenza *et al.*, (2009) e de Krauth-Siegel e Comini, (2008), identificaram e caracterizaram a ação de diferentes enzimas antioxidantes que atuam frente a metabólitos oxidativos. No presente trabalho, foi avaliado a tripanotiona sintetase (TcTS), tripanotiona redutase (TcTR), triparedoxina peroxidases citosólica (TcCPX) e mitocondrial (TcMPX), e a hemoperoxidase dependente de ascorbato (TcAPX), as quais tem a capacidade de detoxificar H₂O₂ e pequenas cadeias orgânicas de hidroperóxidos. Além destas peroxidases, também foi avaliado as ferro-

superóxido dismutases (Fe-SOD) as quais detoxificam O_2^- . Piacenza *et al.*, (2013) mostraram que estas enzimas antioxidantes são os principais fatores de virulência, reduzindo o efeito do estresse nitro-oxidativo durante a doença de Chagas.

Vários estudos têm sugerido que a variação do número de cópias gênicas pode ser um mecanismo usado por tripanossomatídeos para aumentar a expressão gênica, podendo afetar o fitness do parasito (Reis-Cunha *et al.*, 2015; Genoís *et al.*, 2014; Ubeda *et al.*, 2008). No presente trabalho avaliamos o número de cópias dos genes antioxidantes selecionados, bem como a expressão destes genes durante a infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais e a infecção *in vivo* de camundongos C57BL/6.

Inicialmente foram obtidas as sequências consenso dos genes antioxidantes selecionados nos genomas das cepas Arequipa e Colombiana (Fig. 26 e 27). Posteriormente, estas sequências foram utilizadas para verificar o número de cópias de cada um destes genes que codificam enzimas antioxidantes no genoma das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*. Os resultados destas análises *in silico* mostraram diferenças no número de cópias dos genes TcCPX que teve duas vezes mais cópias no clone CL Brener, comparada com as cepas Arequipa e Colombiana. Além disso, observou-se uma tendência de aumento do número de cópias do gene TcSodA em relação à cepa Colombiana e ao clone CL Brener, comparadas com a cepa Arequipa (Fig. 28 e 29).

Usando uma abordagem complementar, nós também avaliamos o número de cópias dos genes antioxidantes através de análises *in vitro*, utilizando a quantificação relativa por PCR em tempo real, baseada no sistema de variação de Ct comparativo. Metodologias semelhantes foram utilizadas por Ferreira *et al.*, (2006), com a finalidade de verificar a quantidade de cópias gênicas em um genoma específico. Assim como os resultados *in silico*, estas análises *in vitro* também não mostraram grandes diferenças no número de cópias dos genes antioxidantes entre as três cepas de *T. cruzi* avaliadas neste estudo, com exceção ao gene TcCPX, onde se verificou um aumento substancial no número de cópias em CL Brener comparado a Arequipa e Colombiana, corroborando as análises *in silico*. Por outro lado, ao comparar o número de cópias dos genes antioxidantes entre si, os resultados mostraram que os genes TcCPX, TcSodA e TcSodB são os que tiveram maior número de cópias nos genomas das cepas de *T. cruzi* avaliadas neste estudo (Fig. 35). Estes dados são concordantes com os achados de Peluffo *et al.*, (2004) e Ismail *et al.*, (1997) que mostraram que os genes TcCPX, TcSodA e TcSodB são

as principais enzimas antioxidantes envolvidas nos processos de defesa do parasito. Outro estudo, que corrobora estes achados, mostrou que a superexpressão da enzima antioxidante TcCPX confere maior proteção frente a radicais livres como o peroxinitrito quando comparado com os menores níveis de expressão do gene em parasitos selvagens (Piacenza *et al.* 2009).

Prosseguimos então com a avaliação dos níveis de expressão das enzimas antioxidantes das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi*, em diferentes tempos após a infecção de macrófagos peritoneais. Os resultados mostraram aumento na expressão dos principais genes antioxidantes, o qual foi dependente da cepa de *T. cruzi* utilizada neste estudo. Na cepa Arequipa, caracterizada como DTU I, a qual apresentou baixos percentuais de sobrevivência e multiplicação no interior de macrófagos peritoneais, observou-se nos tempos iniciais de infecção uma menor expressão para todos os genes avaliados quando comparado com o clone CL Brener. Apenas em estágios mais tardios da infecção (48 ou 72 horas), verificou-se níveis semelhantes ou maiores de expressão de alguns genes (TcCPX, TcTrS, TcSODA e TcSODB) em Arequipa quando comparado às outras cepas. Na cepa Colombiana, caracterizada também como DTU I, a qual apresentou percentuais de sobrevivência e multiplicação no interior dos macrófagos peritoneais maiores que a cepa Arequipa, tiveram aumento significativo de expressão dos genes TcMPX, TcTrR, TcTrS e TcCPX, quando comparada com a cepa Arequipa (3 e 48 horas após a infecção inicial) e os genes TcSodA e TcSodB, quando comparada com a cepa Arequipa e com o clone CL Brener (3, 24 e 48 horas após a infecção inicial). No clone CL Brener, caracterizado como DTU VI e com os maiores percentuais de sobrevivência e multiplicação no interior dos macrófagos peritoneais, foi observado aumento significativo na expressão dos genes TcMPX TcTrR e TcSodA quando comparado com a cepa Arequipa (24 e 48 horas após a infecção inicial) e os genes TcAPX, TcCPX, TcTrS e TcSodB quando comparado com as cepas Arequipa e Colombiana (24, 48 e 72 horas após a infecção inicial) (Fig. 37A, B, C, D, E, F e G). Semelhante com nossos resultados, trabalhos como de Piacenza *et al.*, (2013) e Alvarez *et al.*, (2011) mostraram que cepas altamente infectantes e virulentas possuem alta expressão do gene TcCPX e, portanto, foram mais resistentes à morte mediada por macrófagos, principalmente devido a detoxificação do OONO⁻. Do mesmo modo De Souza *et al.*, (2003) mostraram que a alta expressão de enzimas antioxidantes em tripomastigotas aumenta a infectividade, com evidência de um aumento de três vezes na parasitemia e elevados índices de proliferação no interior de células

hospedeiras. Resultados de Piacenza *et al.*, 2013, reforçam o conceito que o sucesso da infecção depende dos níveis de expressão das enzimas antioxidantes do parasito, destacando-se neste estudo as enzimas TcCPX e TcSodB; esta última particularmente importante em nossos resultados com a cepa Colombiana, atuando como uma enzima de defesa antioxidante. Da mesma forma, parece que a enzima TcSodA pode agir não só como um sensor do estresse oxidativo, mas também na defesa bioquímica deste parasito. Finalmente, todos estes resultados mostraram que a expressão de enzimas antioxidantes pelo parasito é um processo extremamente importante que permite a adaptação de *T. cruzi* ao ambiente nitrooxidativo encontrado nos macrófagos. Outros trabalhos como de Atwood *et al.*, (2005) e Parodi-Talice *et al.*, (2007), mostraram um aumento na síntese de enzimas antioxidantes (TcTrS; TcMPX; TcSodA e TcAPX) de *T. cruzi* em tripomastigotas metacíclicos infectantes, quando foram comparados com os epimastigotas não infectantes. Do mesmo modo, Piacenza *et al.*, 2009 encontraram também uma associação positiva entre a infectividade e virulência com os níveis das enzimas antioxidantes, principalmente das enzimas TcCPX, TcMPX e TcTrS, destacando a interação entre a defesa destas enzimas e os mecanismos oxidativos do hospedeiro. Devido às características únicas dos componentes do sistema antioxidante de tripanosomatídeos, atualmente vem sendo considerados como excelentes alvos para quimioterapia.

Os resultados obtidos neste trabalho revelam que a cepa Arequipa de *T. cruzi* tem uma menor infectividade em macrófagos peritoneais, quando comparado com a cepa Colombiana e com o clone CL Brener, uma vez que apresentou menores taxas de infecção e multiplicação no interior destas células. Além disso, a cepa Arequipa apresentou menores níveis de expressão das principais enzimas antioxidantes principalmente nos tempos iniciais de infecção, o que significa que esta cepa tem menor capacidade de proteger-se frente ao estresse nitrooxidativo dos macrófagos o que corroborou os resultados expostos previamente.

Tópico II

Após avaliar a capacidade infectante das cepas Arequipa, Colombiana e clone CL Brener em macrófagos *in vitro*, foi realizado estudos de infecção experimental *in vivo*, com a finalidade original de relacioná-los com os dados obtidos na infecção *in vitro*. Com este fim, a cepa Arequipa caracterizada como de menor capacidade proliferativa nas infecções *in vitro* de macrófagos peritoneais foi inoculada em camundongos C57BL/6, sendo os resultados negativos em todas as tentativas de infecção (dados não mostrados). Nós então realizamos a reativação desta cepa, alimentando o vetor triatomíneo com sangue contendo epimastigotas e tripomastigotas de cultura desta cepa, utilizando um dispositivo de membrana conforme descrito por Garcia e Azambuja, (1997). A menor capacidade infectante *in vivo* da cepa Arequipa de *T. cruzi*, ocorreu provavelmente pelas várias passagens da forma epimastigota em meio de cultura LIT e subsequente manutenção da forma tripomastigota em cultura de células L6 (mioblastos) em meio RPMI. Após o sucesso da infecção de triatomíneos, os tripomastigotas metacíclicos da cepa Arequipa reativada (Arequipa-RE) de *T. cruzi* foram utilizados para infectar camundongos C57BL/6 tendo se detectado parasitemia positiva após a primeira semana de infecção. Já foi verificado que a infecção de triatomíneos com a fase epimastigota desta cepa e posterior diferenciação em tripomastigotas metacíclicos promove aumento de algumas enzimas antioxidantes (Piacenza *et al.*, 2009b). Estes autores demonstraram que durante a metaciclogênese existe um aumento nos níveis das enzimas TcCPX, TcMPX e TcTrS, sendo este aumento mais pronunciado nas cepas mais virulentas.

Os tripomastigotas da cepa Arequipa-RE foram utilizados para infecções *in vitro* de macrófagos peritoneais, após sua manutenção em cultura em células L6. A infecção de macrófagos peritoneais foi realizada como descrito previamente, e foi analisado os níveis de expressão das enzimas antioxidantes semelhante ao realizado para a cepa Arequipa não infectante. Os resultados mostraram diferenças significativas na expressão das principais enzimas antioxidantes, TcAPX, TcCPX, TcMPX e TcTrS (Fig. 39A, B, C e E) nas primeiras horas após a infecção inicial, o que pode explicar pelo menos em parte o aumento da virulência da cepa Arequipa-RE de *T. cruzi*. Como descrito por Piñeyro *et al* (2008) e Piacenza *et al.*, (2009), a efetividade do sistema antioxidante tem uma correlação direta com o sucesso da infecção, sendo que o aumento na expressão destas enzimas, como mencionado também por

Atwood *et al.*, (2005) permite o parasito lidar com o ambiente oxidativo no interior dos macrófagos. Assim como verificado em nosso trabalho, o aumento na expressão das enzimas TcAPX e principalmente TcCPx e TcMPX foi associado ao aumento da virulência do parasito (Piñeyro *et al.*, 2008 e Piacenza *et al.*, 2009a). Do mesmo modo, Piacenza *et al.*, (2009); Fairlamb e Cerami (1992) mencionaram que as defesas antioxidantes têm um papel importante na redução de moléculas oxidantes (peróxidos) e em consequência a manutenção de um ambiente celular redutor, ótimo para o desenvolvimento do parasito. Assim como verificado na comparação entre Arequipa, Colombiana e CL Brener, quando a primaria cepa só apresentou níveis mais altos de expressão em tempos mais tardios da infecção, a variante não infectante da cepa Arequipa apresentou maiores níveis das enzimas TcAPX, TcCPX, TcSodA e TcSodB em relação à variante Arequipa-RE somente no tempo de 72 horas após infecção inicial (Fig. 39A, B, F e G). No caso da enzima TcTrR não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as duas cepas avaliadas neste estudo (Fig. 39D). A expressão nas primeiras 3 horas após infecção inicial das enzimas TcAPX, TcCPX, TcMPX e TcTrS pode ser de fundamental importância para o parasito, e a variação dos níveis destas enzimas pode permitir o desenvolvimento do parasito durante a infecção no hospedeiro vertebrado.

Tripomastigotas das cepas Arequipa-RE, Colombiana e do clone CL Brener de *T. cruzi*, foram utilizados para os estudos de infecção experimental em camundongos. O modelo camundongo é amplamente utilizado para o desenvolvimento de pesquisa sobre a doença de Chagas, como já demonstrado em vários trabalhos incluindo os de Andrade *et al.*, (1999) e Diaz *et al.*, (2004), que mostraram que estes animais mimetizam de forma adequada aspectos da doença humana relacionados ao dano tecidual a repostas imunológicas envolvidas no controle do parasito. Neste estudo, foi utilizado como modelo o camundongo da linhagem isogênica C57BL/6, sendo descrito por Pizzi *et al.*, (1948) e Postan *et al.*, (1984) como um dos animais mais resistentes à infecção por diferentes cepas de *T. cruzi*, permitindo avaliar com certa facilidade a fase crônica de doença. Os camundongos C57BL/6 infectados com as cepas e o clone de *T. cruzi*, foram divididos em diferentes grupos experimentais, permitindo avaliar as fases aguda (com elevada parasitemia) e crônica (com parasitemia não detectada). Os resultados mostraram que camundongos infectados com a cepa Arequipa-RE, apresentaram baixos níveis de parasitemia, com presença de parasitos no sangue a partir do sétimo dia pós-infecção e o pico da parasitemia no dia 21 pós-infecção, com sobrevivência dos camundongos

de todos os grupos experimentais (Fig. 40A, B). Do mesmo modo, camundongos infectados com a cepa Colombiana tiveram níveis de parasitemia semelhantes com a cepa Arequipa-RE, com presença de parasitos no sangue a partir do sétimo dia pós-infecção e o pico da parasitemia no dia 27 pós-infecção, com sobrevivência dos camundongos em todos os grupos experimentais (Fig. 40A, B). Em contrapartida, camundongos infectados com o clone CL Brener apresentaram altos níveis de parasitemia, com presença de parasitos no sangue a partir do sexto dia pós-infecção, esta cepa apresentou 2 picos de parasitemia no dia 15 e no dia 21 pós-infecção (Fig. 40A), além disto, a sobrevivência dos camundongos foi menor durante a infecção com esta cepa, causando a morte de três camundongos no grupo experimental do dia 120 pós-infecção (Fig. 40B). Nossos resultados são concordantes com trabalhos descritos por Wrightsman *et al.*, (1982), onde mostraram que camundongos infectados com a cepa Brasil, que apresentaram altos níveis de parasitemia na fase aguda, morrem num período curto de tempo, enquanto aqueles que apresentaram baixos níveis, sobreviveram à infecção por este parasito. Da mesma forma, trabalhos como de Reis Machado *et al.*, (2014), mostraram que a infecção de camundongos com a cepa Colombiana, tiveram baixa parasitemia nos primeiros dias após infecção inicial e um aumento progressivo destes níveis após 21 dias de infecção. Em contrapartida, estudos como de Rodrigues *et al.*, (2010) e De Lourdes (tese, 2013) mostraram que a infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6 com o clone CL Brener de *T. cruzi* mostraram altos níveis de parasitemia e mortalidade. Estes resultados sugerem que a magnitude da parasitemia pode ser um fator responsável da morte de camundongos. Em contrapartida, Andrade (1990); Andrade e Ramalho (1966), mostraram que camundongos resistentes da linhagem B10.S infectados com a cepa Peru de *T. cruzi* apresentaram níveis de parasitemia semelhantes ou superiores aos de camundongos susceptíveis. Portanto é importante considerar que durante a fase aguda da doença de Chagas, o nível de parasitemia e parasitismo cardíaco depende da cepa infectante. Do mesmo modo, Roffe *et al.*, (2012), mostraram que camundongos C57BL6 infectados com a cepa Colombiana tiveram uma mortalidade inferior a 10%, quando comparado com camundongos C3H/HeSnJ sensíveis a infecção por este parasito, onde a mortalidade foi de 100%, embora estes dados sejam discordantes com os de Talvani *et al.*, (2000) e Michailowsky *et al.*, (2004), onde a infecção de camundongos C57BL/6 com a cepa Colombiana mostrou altas taxas de mortalidade.

Neste estudo, após de avaliar a parasitemia e a sobrevivência, visamos avaliar a cinética do parasitismo tecidual e determinar se a carga parasitária afeta a resposta imune celular do hospedeiro com a síntese de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, especificamente no tecido cardíaco de camundongos previamente infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e clone CL Brener. Como mencionado anteriormente, uma das vantagens do modelo C57BL/6 é a alta taxa de sobrevivência do animal. Além disso, o tropismo cardíaco que apresentam as cepas de *T. cruzi* possibilita o estudo da indução e resolução do parasitismo tecidual, corroborado pela expressão de citocinas que auxilia no controle da proliferação do parasito, mas que pode acarretar em dano tecidual destes animais. A este respeito, estudos de infecção de camundongos sensíveis como a linhagem BALB/c com o clone CL Brener de *T. cruzi*, feitos por Rodrigues *et al.*, (2010), mostraram altos níveis de carga parasitária no tecido cardíaco, assim como um aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias com maiores taxas de mortalidade devido provavelmente a uma resposta inflamatória sistêmica. Em nosso estudo, observamos que a variabilidade genética entre as cepas Arequipa e Colombiana e o clone CL Brener está em certo nível associada com a magnitude da infecção tecidual, mas também observamos diferenças durante a infecção experimental entre as cepas Arequipa-RE e Colombiana de *T. cruzi*, ambas pertencentes a DTU TcI. Da mesma forma, estudos de infecção experimental em camundongos BALB/c com a cepa JG da linhagem DTU TcII e o clone Coll.7G2 da linhagem DTU TcI, feitos por Andrade *et al.* (1999, 2010), mostraram que estes parasitos apresentaram diferenças no tropismo, evidenciando maior carga parasitária da cepa JG no coração e do clone Coll.7G2 no cólon (reto), destes animais com infecção mista. Estes mesmos autores mostraram que a cepa JG apresentou uma maior eficiência na multiplicação intracelular em cultura de cardiomiócitos primários de camundongos BALB/c, quando comparado com o clone Coll.7G2. A avaliação da carga parasitária no tecido cardíaco, colón e músculo esquelético mostrou que as cepas Arequipa-RE, Colombiana e o clone CL Brener tem maior preferência de invadir o tecido cardíaco (Fig. 42A, B, C). Em contrapartida, as cepas Arequipa-RE e Colombiana apresentaram maior tropismo pelo colón (Fig. 42A, B) quando comparado com o clone CL Brener que apresentou um maior tropismo pelo músculo esquelético (Fig. 42C), embora cada uma das cepas tenha diferente capacidade proliferativa nestes órgãos. No coração e músculo esquelético, nos dias 5, 15 e 30 pós-infecção, foi detectado maior quantidade de parasitos do clone CL Brener, quando comparado com as cepas

Arequipa-RE e Colombiana (Fig. 42D e E), assim também foi detectado maior quantidade de parasitos da cepa Colombiana, quando comparado com a cepa Arequipa-RE em ambos tecidos. No dia 60 pós-infecção o parasitismo tecidual diminuiu fortemente na infecção com todas as cepas nos diferentes tecidos, mas ainda foi detectado maior quantidade de parasitos da cepa Colombiana e do clone CL Brener, quando comparados com a cepa Arequipa-RE.

Estes resultados foram obtidos a partir da amplificação de DNA dos órgãos de camundongos infectados com as cepas e o clone de *T. cruzi*, o qual teve uma boa sensibilidade para a detecção do DNA genômico do parasito utilizando PCR em tempo real (Fig. 41). Trabalhos como de Talvani *et al.*, (2000) demonstraram também que apesar de baixos níveis de parasitismo tecidual avaliados com técnicas clássicas de histopatologia a grande maioria dos animais infectados foram positivos quando se analisou o DNA genômico do *T. cruzi* utilizando PCR. Da mesma forma trabalhos como de Jones *et al.*, (1993), Higuchi *et al.*, (1993) e Vago *et al.*, (1996) mencionaram também que, embora o parasitismo tecidual tenha níveis baixos, este é um componente essencial da inflamação durante a fase crônica da doença de Chagas. A este respeito, trabalhos como de Zúñiga *et al.*, 1998 e 2007, mostraram que durante as fases iniciais da doença de Chagas a estimulação excessiva do sistema imune promove processos inflamatórios, sendo que esta inflamação estaria relacionada como o aumento da mortalidade dos animais infectados. Por outro lado, Roggero *et al.*, 2002, mostraram que não houve relação entre a carga parasitária e a susceptibilidade de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com a cepa Tulahén de *T. cruzi* sendo que a imunidade adquirida pode controlar posteriormente a carga parasitária tecidual e a parasitemia e também poderia produzir os danos no tecido cardíaco. Do mesmo modo, neste estudo foi observada uma relação entre a diminuição da parasitemia e carga parasitária tecidual nos camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e o clone CL Brener de *T. cruzi*, com o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias (INF- γ , TNF- α e IL-12). Sendo mais notória esta relação, em camundongos infectados com a cepa Arequipa-RE, onde o aumento INF- γ observado nos tecidos cardíacos promoveria um aumento na produção de NO e EROs pelas células da resposta imune, os quais eliminam eficientemente ao parasito. Neste sentido, foi avaliada a expressão de citocinas pró-inflamatórias (INF- γ , TNF- α e IL-12) e anti-inflamatórias (IL-10) no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas Arequipa-RE, Colombiana e o clone CL Brener (Fig. 44). Segundo os estudos *in vitro* de Machado *et al.*, (2000), os

componentes da imunidade no tecido cardíaco juntamente com os cardiomiócitos participam ativamente na resposta frente à infecção, através da produção de citocinas, modulando a resposta inflamatória e controlando a replicação do parasito. Nossos resultados mostraram maior expressão de todas as citocinas, no primeiro dia avaliado (5 dias pós-infecção) para a cepa Arequipa-RE, quando comparado com a expressão nas outras cepas. À medida que a infecção progrediu, houve uma tendência de inversão, com maior produção das citocinas em Colombiana e CL Brener quando comparado com a cepa Arequipa. Estes resultados no início da infecção sugerem que o menor parasitismo no coração dos animais infectados pela cepa Arequipa-RE, em relação ao observado para a cepa Colombiana e o clone CL Brener, pode ter relação com a maior indução da expressão das citocinas pró-inflamatórias por Arequipa-RE quando comparado com as outras duas cepas.

As maiores diferenças de produção de citocinas entre as cepas foi em relação a produção de IFN- γ 5 dias pós-infecção, com Arequipa-RE induzindo cerca 6 e 4 vezes maiores níveis desta citocina quando comparado com Colombiana e CL Brener, respectivamente (Fig. 44A). Posteriormente, houve expressão de menores níveis de IFN- γ no tecido cardíaco em Arequipa-RE na comparação com as outras duas cepas. Em concordância, estudos de infecção neste mesmo modelo experimental (C57BL/6) descritos Talvani *et al.*, (2000), mostraram que o controle da parasitemia e carga parasitária foi relacionado com a expressão intensa de IFN- γ no início da infecção e diminuição da mesma, uma vez controlada a replicação parasitária. A importância do IFN- γ para o controle da replicação parasitária foi também evidenciada em diversos outros trabalhos como o de Michailowsky *et al.* (2001) que mostraram que camundongos IFN- γ KO infectados com a cepa Colombiana têm aumento da carga parasitária principalmente no coração e no SNC. Tarleton e Zhang, (1999) mostraram que altos níveis de IFN- γ durante as fases iniciais da infecção inibem o crescimento do parasito e promovem a cura da doença, sendo que o desenvolvimento da doença cardíaca está relacionada com a persistência do parasito neste tecido. Neste estudo, a expressão de TNF- α em camundongos infectados com as cepas de *T. cruzi* foi maior no dia 30 pós-infecção com uma diminuição gradual até os dias 60 e 120 pós-infecção (Fig 44C), o qual foi concordante com aumento da parasitemia e da carga parasitária no coração dos camundongos infectados, que ocorreu entre o dia 15 e 30 pós-infecção (Fig. 40A e 42D). A cinética de expressão desta citocina foi semelhante nas três cepas de *T. cruzi*, embora em tempos mais tardios da infecção a cepa Arequipa-RE induza menor expressão desta citocina, Colombiana, níveis intermediários e CL Brener, maiores níveis (Fig. 44C). Em vários trabalhos como os de

Gomes *et al.*, (2003) e Talvani *et al.*, (2004) foi demonstrado que a progressão da severidade da lesão cardíaca está associada com o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α . Da mesma forma, Camargo *et al.*, (1997a, b) e Abrahamsohn e Coffman, (1995) mostraram que, após a replicação nos tecidos, o *T. cruzi* começa a promover a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e TNF- α , principalmente pelos macrófagos teciduais. Foi também descrito que IFN- γ junto com o TNF- α tem um papel importante na resistência do hospedeiro, através da ativação dos macrófagos, que por sua vez produzem altos níveis de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. O papel do TNF- α em relação com o IFN- γ é controverso. Alguns trabalhos como de Goldem e Tarleton (1991) mostraram que TNF- α e IFN- γ não atuam sinergicamente no aumento da capacidade tripanocida, enquanto que Muñoz-Fernández *et al.*, (1992) mostraram o papel sinérgico destas duas citocinas no controle da replicação parasitária.

Assim como verificado com IFN- γ , nós também verificamos grandes diferenças entre as cepas na expressão de IL-12, 5 dias após a infecção, com Arequipa-RE induzindo cerca de 4 e 5 vezes maiores níveis quando comparado com Colombiana e CL Brener, respectivamente (Fig 44D). No tempo de 30 dias pós-infecção, houve uma inversão, com Arequipa-RE induzindo menores níveis de IL-12 que as outras duas cepas e posteriormente as cepas induziram níveis semelhantes. Estudos como de Aliberti *et al.* (1996), mostraram uma relação direta entre a produção de IL-12 na resistência do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi*, atuando na diferenciação da resposta para Th1. Quando foram utilizados anticorpos monoclonais anti-IL-12, foi observado um aumento da suscetibilidade de camundongos infectados com *T. cruzi*, com aumento da parasitemia e mortalidade. Do mesmo modo, Graefe *et al.*, (2003) mostraram também aumento da parasitemia e da carga parasitária em camundongos IL-12p40 KO infectados com a cepa Tulahuén de *T. cruzi*.

Finalmente, neste estudo foi avaliada a expressão de IL-10, citocina anti-inflamatória. Os resultados mostraram uma maior expressão desta citocina nos dias 5 e 15 pós-infecção, no caso de camundongos infectados com a cepa Arequipa - RE, com uma leve diminuição a partir do dia 30 pós-infecção. Contrariamente, foi observado um aumento progressivo na expressão desta citocina desde o dia 5 pós-infecção, no caso de camundongos infectados com a cepa Colombiana e com o clone CL Brener, até o dia 120 e 60 pós-infecção, respectivamente. (Fig. 44B). Como visto previamente, a parasitemia e o parasitismo tecidual estão relacionados com os níveis de IFN- γ , embora uma expressão exarcebada desta citocina pode também promover danos teciduais

crônicos, tornando-se importante a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10, principalmente durante a fase aguda da infecção. Segundo Fiorentino *et al.*, (1991), HSU *et al.*, (1989) e D'Andrea *et al.*, (1993) a IL-10 é responsável de inibir a produção de INF- γ e IL-12 e também diminuir os efeitos potencialmente lesivos dos macrófagos sobre os tecidos do hospedeiro. Por outro lado, ensaios de infecção de macrófagos *in vitro* e infecção de camundongos sensíveis e resistentes ao *T. cruzi*, como de Gazzinelli *et al.*, (1992) e Silva *et al.*, (1992) mostraram que IL-10 inibe a destruição intracelular de *T. cruzi*. Assim também Reed *et al.*, (1994), Holscher *et al.*, (200), Abrahamsohn *et al.*, (1996) e Hunter *et al.*, (1996) mostraram que camundongos IL-10 KO controlam eficientemente a infecção por *T. cruzi*, reduzindo os níveis de parasitismo e promovendo aumento na produção de INF- γ , TNF- α e IL-12. Estes mesmos autores mostraram que camundongos deficientes em IL-10, devido à inativação genética ou neutralização imunológica, morrem mais rápido durante a infecção aguda com *T. cruzi*, devido principalmente a miocardites o que pode ser resultado do descontrole na produção de citocinas pró-inflamatórias, na ausência de IL-10. Por outro lado, Gomes *et al.*, (2003), mostraram uma alta expressão de IL-10 em monócitos de pacientes chagásicos com a forma indeterminada da doença. Deste modo, foi sugerido que nos indivíduos assintomáticos o número de parasitos no início da infecção é reduzido, limitando as lesões e regulando a resposta imune. Estes autores relataram ainda que indivíduos com a forma cardíaca podem controlar o parasitismo, embora não consigam promover uma resposta imunoreguladora, o que desencadeia a inflamação tecidual permanente. Vários estudos como os feitos por Bahia-Oliveira *et al.*, (2000) e Gomes *et al.*, (2003) demonstraram que existe uma correlação entre a produção de IFN- γ e uma patologia cardíaca congestiva grave e também demonstraram que a produção de IL-10 é importante no controle da imunopatologia. Além disso, Talvani *et al.*, (2000), mostraram que a regulação da expressão de IFN- γ associada com a diminuição do parasitismo tecidual pode estar envolvida no controle da inflamação e imunopatogenia do tecido cardíaco durante a infecção experimental com *T. cruzi*. Desta forma, como perspectiva deste trabalho, será importante realizar análises histopatológicas do tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com as três cepas para quantificação de infiltrados inflamatórios e dano tecidual induzido em cada uma das infecções.

7 CONCLUSÃO

O parasito *T. cruzi* é muito variável em suas características genótípicas, capacidade infectante e imunogênica; sendo que diferentes cepas deste parasito podem ser altamente infectantes e evadir ativamente o sistema de defesa do hospedeiro. Neste trabalho, nossos resultados demonstraram que cepa Arequipa de *T. cruzi* da linhagem DTU I, proveniente da região endêmica do Peru, é uma cepa de menor capacidade infectante e proliferativa; a qual apresentou uma maior indução de NO e EROS e uma menor expressão de enzimas antioxidantes nos tempos iniciais da infecção experimental de macrófagos *in vitro*. Tomados conjuntamente, estes dados indicam a menor capacidade deste isolado de sobrepujar o estresse nitrooxidativo no interior dos macrófagos peritoneais, quando comparado com cepas mais virulentas. Estes resultados foram também corroborados por vários estudos de interação parasitos – hospedeiro, onde demonstraram que uma alta ou baixa capacidade infectante de *T. cruzi* está relacionada com a expressão de enzimas antioxidantes que inibem NO e EROs, produzidas após a fagocitose dos tripomastigotas de *T. cruzi* pelos macrófagos. Assim também, a baixa expressão de principais enzimas antioxidantes como TcCPX, TcSodA e TcSodB pela cepa Arequipa reforça o conceito de que estas moléculas podem ser alvos promissores para o desenvolvimento de drogas contra a doença de Chagas.

Neste trabalho, também foi possível identificar alguns fatores imunológicos associados com a menor virulência e infectividade da cepa Arequipa, quando comparado com a cepa Colombiana e o clone CL Brener de *T. cruzi*. Nossos resultados demonstraram que a cepa Arequipa promove uma maior expressão das citocinas pró-inflamatórias como INF- γ , TNF- α e IL-12 nos tempos iniciais de infecção *in vivo*, as quais controlaram de forma eficiente tanto a parasitemia como a carga parasitária tecidual em camundongos C57BL/6 infectados com esta cepa de *T. cruzi*. Nestes animais, a cepa Arequipa também estimulou uma alta expressão de IL-10, a qual está relacionada com modulação da resposta imune, promovendo a diminuição da inflamação ativada inicialmente pelo INF- γ . Finalmente, estes dados da resposta imune também demonstraram a menor capacidade infectante e proliferativa da cepa Arequipa, durante a infecção experimental *in vivo*. De forma notória, esta cepa mostrou-se mais susceptível aos efeitos inibitórios das citocinas pró-inflamatórias.

8 PERSPECTIVAS

A fim de continuar avaliando as características intrínsecas relacionadas a virulência da cepa Arequipa de *T. cruzi*, assim como sua capacidade patogênica *in vivo*, como perspectivas deste trabalho propõe-se:

1- Comparação das características infectantes e das respostas efectoras de macrófagos peritoneais, após a infecção com a cepa Arequipa não infectante e reativada.

2- Comparação da expressão gênica da cepa Arequipa não infectante e a reativada no modelo de infecção de macrófagos peritoneais por RNA-seq.

3- Avaliação histopatológica do tecido cardíaco de camundongos infectados com a cepa Arequipa não infectante e reativada.

9 BIBLIOGRAFIA

1. ABEL L.C., RIZZO L.V., IANNI B., ALBUQUERQUE F., BACAL F., CARRARA D., BOCCHI E.A., TEIXEIRA H.C., MADY C., KALIL J., CUNHA-NETO E. 2001. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun*, 17(1): 99-107.
2. ABRAHAMSOHN I. A., COFFMAN R. L. 1995. Cytokine and nitric oxide regulation of immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection, *J. Immunol*, 155: 3955-3963.
3. ABRAHAMSOHN I. A.; COFFMAN R. L. 1996. IL-10, TNF- α , INF- γ and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Experimental Infection*, v.84, p: 231-244.
4. AGGARWAL S., GHILARDI N., XIE M. H., DE SAUVAGE F. J., GURNEY A. L. 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 Tcell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*, 278: 1910-1914.
5. ALCANTARA A. AND BRENER Z. 1978. The *in vitro* interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. *Acta tropica*, 35(3): 209-219.
6. ALIBERTI J. C.; CARDOSO M. A.; MARTINS G. A.; GAZZINELLI R. T.; VIERA L. O.; SILVA J. S. 1996. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infection and Immunity*, v.64, p: 1961-1967.
7. ALVAREZ M. N., PELUFFO G., PIACENZA L., RADII R. 2011. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity," *The Journal of Biological Chemistry*, v. 286, no. 8, p: 6627-6640.
8. ALVES M. J. M., ABUIN G., KUWAJIMA V. Y., AND COLLI W. 1986. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 21, p: 75-82.
9. AMEISEN J. C., IDZIOREK T., BILLAUT-MULOT O., LOYENS M., TISSIER J. P., POTENTIER A., OUAISSI A. 1995. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): Implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival, *Cell Death Differ*, 2: 285-300.
10. ANAYA E. 1994. Análisis isoenzimático de las cepas de *Trypanosoma cruzi* obtenidas en las regiones norte y sur del Perú (Tesis). U.N.M.S.M. Lima.
11. ANDRADE Z. A. AND RAMALHO C. M. P. 1966. Miocardite chagásica. Estudio morfológico de 38 casos comprobados pelo encontro de parasitos nas seccoes histológicas. *Gazeta Médica Bahia*, v. 66, pp. 55-67.
12. ANDRADE S. G. 1990. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronicmyocardiopathy in mice. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 85, no. 1, p: 17-27.
13. ANDRADE, S. G; MAGALHÃES, J. B. 1996. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop*, 30(1): 27-35.

14. ANDRADE L. O., MACHADO C. R., CHIARI E., PENA S. D., MACEDO, A. M. 1999. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Molecular and biochemical parasitology*, 100(2): 163-172.
15. ANDRADE L. O., ANDREWS N. W. 2005. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat. Rev. Microbiol*, 3: 819-823.
16. ANDREWS N. W.; WHITLOW M. B. 1989. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.33, p: 249-256.
17. ANDREWS N. W. 1990. The acid-active hemolysin of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*, 71: 241-244
18. ANONYMOUS, 1999. Recommendations from a satellite meeting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94 (Sup. 1): 429-432.
19. ANTÚNEZ M. I. AND CARDONI R. L. 2001. Early IFN-gamma production is related to the presence of interleukin (IL)-18 and the absence of IL-13 in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol Lett*, 79(3): 189-96.
20. APT B. W., HEITMANN G. I., JERCIC L. M. I. 2008. Guidelines for the Chagas disease: Part II. Chagas disease in adults, infancy and adolescence. *Rev. Chil. Infectol.*, v.25, n.3, p: 194-199.
21. ARAUJO F. F., GOMES J. A., ROCHA M. O., WILLIAMS-BLANGERO S., PINHEIRO V. M., *et al.*, 2007. Potential role of CD4+CD25High regulatory T cells in morbidity in Chagas' disease. *Front Biosci*, 12: 2797-2806.
22. ATWOOD, J. A. 2005. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*, 309 (5733): 473-476.
23. AUFDERHEIDE A. C.; SALO W.; MADDEN M.; STREITZ J.; BUIKSTRA J.; GUHI F.; ARRIAZA B.; RENIER C., WITTMERS L. E. Jr., FORNACIARI G., ALLISON M. A. 2004. 9000-year Record Chagas's disease. *PNAS*, v.101, p: 2034-2039.
24. AYAQUI R. AND CÓRDOVA E. 1988. Infección natural de *Rattus rattus* y *Cavia porcellus* por *Trypanosoma cruzi*. Chagas 1909 en la localidad de Murco, Arequipa 1988. IX Congreso Nacional de Biología, Piura – Perú. Res. 182.
25. BAFICA A., SANTIAGO H. C., GOLDSZMID R., ROPERT C., GAZZINELLI R. T., SHER A., 2006. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol*, 177: 3515-3519.
26. BAHIA-OLIVEIRA L. M., GOMES J. A., CANÇADO J. R., FERRARI T. C., LEMOS E. M., LUZ Z. M., MOREIRA M. C., GAZZINELLI G., CORREA-OLIVEIRA R. 2000. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *J Infect Dis*, 182(2): 634-638.
27. BARRETT T. V., HOFF R. H., MOTT K. E., MILES M. A., GODFREY D. G., TEIXEIRA R., ALMEIDA DE SOUZA J. A., SHERLOCK I. A. 1980; Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 74(1): 84-90.

28. BARTHOLOMEU D. C., ROPERT C., MELO M. B., PARROCHE P., JUNQUEIRA C. F., TEIXEIRA S. M., *et al.*, 2008. Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol*, 181: 1333-1344.
29. BELOSEVIC M., DAVIS C. E., MELTZER M. S., NACY C. A. 1988. Regulation of activated macrophage antimicrobial activities. Identification of lymphokines that cooperate with IFN-gamma for induction of resistance to infection. *The Journal of Immunology*, 141(3): 890-896.
30. BERN C., VERASTEGUI M., GILMAN R. H., LAFUENTE C., GALDOS-CARDENAS G., CALDERON M., FERRUFINO L. 2009. Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11): 1667-1674.
31. BERN, C. 2011. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *The New England journal of medicine*, 364: 2527-2534.
32. BICE D. E. AND ZELEDON R. 1970. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *The Journal of parasitology*, p: 663-670.
33. BILLINGSLEY P. F., DOWNE A. E. R. 1986. The surface morphology of the midgut cells of *Rhodnius prolixus* Sta^l (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. *Acta Trop*, 43: 355-366.
34. BITTENCOURT A. L. 2000. Transmissão vertical da doença de Chagas. *Rev Patol Trop*, 29 (Supl.): 101-115.
35. BLOS M., SCHLEICHER U., ROCHA F., MEIßNER U., RÖLLINGHOFF M., BOGDAN C. 2003. Organ specific and stage dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. *European journal of immunology*, 33(5): 1224-1234.
36. BOLGER A. M., LOHSE M., USADEL B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15): 2114-20.
37. BRENER Z. 1989. A descoberta (Homenagem aos 80 anos da descoberta da doença de Chagas). *Memorias do Insituto Oswaldo Cruz*, v. 84, p: 1-6.
38. BRENER Z. AND GAZZINELLI R.T. 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*, 114(2):103-10.
39. BRENER, Z., ANDRADE, Z. A., BARRAL-NETO M., BITTENCOURT A. L. 2000. Transmissão Vertical da doença de Chagas. In: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2^a Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 4 p.
40. BRENIERE F., LLANOS B., TIBAYRENC M., DESDEUX P. 1985. Isoenzymic studies and epidemiological data of *Trypanosoma cruzi* from Arequipa (Perú). Pacific side. *Ann Soc Belge Med Trop*, 65 (1): 63-66.
41. BRISSE S., BARNABE C., TIBAYRENC M. 2000a. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol*, 30: 35-44.

42. BRISSE S., DUJARDIN J. C., TIBAYRENC M. 2000b. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol. Biochem. Parasitol*, 111: 95-105.
43. BRISSE S., VERHOEF J., TIBAYRENC M. 2001. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int. J. Parasitol*, 31: 1218-1226.
44. BRODSKY C. I.; BARRAL-NETTO M. 2000. Resposta Imune Humana na Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p: 170-176.
45. BURGOS J. M., ALTCHER J., BISIO M., DUFFY T., VALADARES H. M., SEIDENSTEIN M. E., *et al.*, 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int. J. Parasitol*, 37: 1319-1327.
46. BURLEIGH B. A., ANDREWS N. W., 1995a. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol*, 49: 175-200.
47. CABRERA C. R. 2008. Enfermedad de Chagas. *Bol Epidemiol (Lima)*, v.17 (53), p: 1005-1007.
48. CABRERA R., VEGA S., VALDERRAMA Y., CABANILLAS K., FERNÁNDEZ C., RODRÍGUEZ O., *et al.* 2009. Probable emergencia de la enfermedad de Chagas en la Amazonía peruana: reporte de 5 casos agudos en Datem del Marañón, Loreto. En: Abstract Book Colloquium Neglected Tropical Disease of Latin America, p: 12-14.
49. CAETANO B. C., CARMO B. B., MELO M. B., CERNY A., DOS SANTOS S. L., BARTHOLOMEU D. C., GOLENBOCK D. T., GAZZINELLI R. T. 2011. Requirement of UNC93B1 Reveals a Critical Role for TLR7 in Host Resistance to Primary Infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 187 (4): 1903-1911.
50. CALCERRADA P., PELUFFO G., RADI, R. 2011. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. *Current pharmaceutical design*, 17(35): 3905-3932.
51. CAMARGO M. M., ALMEIDA I. C., PEREIRA M. E. S., FERGUSON M. A. J., TRAVASSOS L. R., GAZZINELLI R. T. 1997a. Glycosylphosphatidylinositol anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of pro-inflammatory cytokines by macrophages *J. Immunol*, 158: 5890-5901.
52. CAMARGO M. M., ANDRADE A. C., ALMEIDA I. C., TRAVASSOS L. R., GAZZINELLI R. T. 1997b. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania sp.* parasite membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity by IFN- γ -primed macrophages, *J. Immunol*, 159: 6131-6139.
53. CAMPOS M. A. S., ALMEIDA I. C., TAKEUCHI O. 2001. Activation of toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *Journal of Immunology*, v. 167, p: 416-423.
54. CARNIERI E. G., MORENO S. N., DO CAMPO R. 1993. Trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 61: 79-86.

55. CASSADO A. D. A. 2011. Heterogeneidade dos Macrófagos Peritoneais (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
56. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Epidemiology e Risk Factors. 2009. Available from: URL: [http:// www.cdc.gov/chagas](http://www.cdc.gov/chagas).
57. CHAGAS C. 1909. Nova Tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum* n. gen, n. sp., agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.1, p: 159-218.
58. CHANCE B., SIES H., BOVERIS A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59(3): 527-605.
59. CHANG K. P. 1981. Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 30(2): 322-333.
60. CHARMOY M., MEGNEKOU R., ALLENBACH C., ZWEIFEL C., PEREZ C., MONNAT K., TACCHINI-COTTIER F. 2007. *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *Journal of leukocyte biology*, 82(2): 288-299.
61. CHEN W., JIN W., HARDEGEN N., LEI K. J., LI L., MARINOS N., MCGRADY G., WAHL S. M. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, 198: 1875-1886
62. CHIARI E. 1974. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes from cultures kept in laboratory for different periods of time. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 16(2), 61-67.
63. COLLINS M., LING V., CARRENO B. M. 2005. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome biology*, 6(6): 223.
64. COURA J. R., ANUNZIATO N., WILLCOX H. P. 1983. Chagas' disease morbidity. I - Study of cases originating in various states of Brazil, observed in Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 78, n. 3, p: 363-72.
65. COURA J. R., JUNQUEIRA A. C., BÓIA M. N., FERNANDES O. 1999. Chagas disease: from bush to huts and houses. Is it the case of the Brazilian Amazon?. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, suppl. 1, p: 379-384.
66. COURA J. R. 2007. Chagas disease: what is known and what is needed – a background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.102, suppl.1, p: 113-122.
67. CUBA C. A., ABAD-FRANCH F., ROLDÁN R. J., VARGAS V. F., POLLACK V. L., MILES M. A. 2002. The triatomines of northern Peru, with emphasis on the ecology and infection by trypanosomes of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(2): 175-83.
68. CUNHA-NETO E., DURANTI M., GRUBER A., ZINGALES B., DE MESSIAS I., STOLF N., BELLOTTI G., PATARROYO M. E., PILLEGGI F., KALIL J. 1995a. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc. Nati. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 92, n. 8, p: 3541-3545.

69. CUNHA-NETO E., GRUBER A., ZINGALES B., KALIL J. 1995b. Estudo da doença de Chagas: abordagem molecular. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*, 5: 217-229.
70. D'ANDREA A., ASTE-AMEZAGA M., VALIANTE N. M., MA X., KUBIN M., TRINCHIERI G. 1993. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med*, 178: 1041-1048.
71. D'AVILA D. A., MACEDO A. M., VALADARES H. M., GONTIJO E. D., DE CASTRO A. M., MACHADO C. R., et al., 2009. Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. *J. Clin. Microbiol*, 47: 1718-1725.
72. DE ARAUJO-JORGE T. C., BARBOSA H. S., MEIRELLES M. N. 1992. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15-year study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 87: 43-56.
73. DE CARVALHO T. M. U. AND DE SOUZA W. 1989. Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell structure and function*, 14(4): 383-392.
74. DE FREITAS J. M., AUGUSTO-PINTO L., PIMENTA J. R., BASTOS-RODRIGUES L., GONCALVES V. F., TEIXEIRA S. M., et al., 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*, 2 e24.
75. DELGADO S., ERNST K.C., HANCCO PUMAHUANCA M. L., R. YOOL S., COMRIE A., STERLING C. R., GILMAN R. H., NÁQUIRA C., LEVY M. Z. 2013. A country bug in the city: urban infestation by the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in Arequipa, Peru. *International Journal Health Geogr*, v.12, p: 48.
76. DENICOLA A., RUBBO H., RODRIGUEZ D., RADI R. 1993. Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys*, 304: 279-85.
77. DE SOUZA W. 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des* 8: 269-285
78. DE SOUZA R. F., SUSSUCHI E. M., DE GIOVANI W. F. 2003. Synthesis, electrochemical, spectral, and antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Synthesis and reactivity in inorganic and metal-organic chemistry*, 33(7): 1125-1144.
79. DIAS A. C. P. 1989. The indeterminate form of Human Chronic Chagas' disease. A clinical epidemiological study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.22, n.3, p: 147-156.
80. DIAS J. C. P. 2006a. The treatment of Chagas Disease (South American Trypanosomiasis). *Ann Intern Med.*, v.144 (10), p: 772-774.
81. DÍAZ-LIMAY E, ESCALANTE H, JARA C. 2004. Niveles de parasitemia y alteraciones histopatológicas en *Mus musculus* Balb/c infectado con *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Panstrongylus chinai* del valle Chaman, La Libertad – Perú. *Parasitol Latinoam.*, 59(2): 153-58.
82. DOYLE P. S., DVORAK J. A., ENGEL J. C. 1984. *Trypanosoma cruzi*: quantification and analysis of the infectivity of cloned stocks. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 31(2): 280-283.

83. DRÖGE W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1): 47-95.
84. DVORAK J.A., HYDE T.P. 1973. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells *in vitro*. I. Individual interactions and the cellular and subcellular levels. *Exp. Parasitol*, 34: 268-283.
85. ESCOMEL E. 1917. Insectos hemipteros, heterópteros, hematófagos en nuestros valles del Sur del Perú: encierran formas protozoicas, herpetomónicas. ¿Existe entre nosotros la enfermedad de Chagas? "La Ref. Méd." Lima, v.3, p: 121.
86. ESCOMEL E. 1919. La trypanosomiase humaine existe dans les forêts orientales du Pérou. *Bull Soc Pathol Exot*, v.12, p: 723-730.
87. FAIRLAMB A. H. AND CERAMI A. 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual Reviews In Microbiology*, 46(1): 695-729.
88. FELONATO M., PINA A., BERNARDINO S., LOURDES F. V., DE ARUJO E. F., CALICH V. L. 2010. CD28 exerts protective and detrimental effects in a pulmonary model of paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*, 78: 4922-4935.
89. FERNÁN-ZEGARRA L. 1972. Miopatía chagásica esquelética. [Tesis Doctoral]. Lima: Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
90. FERREIRA M. S., LOPES E. R., CHAPADEIRO E., DIAS J. C. P., OSTERMAYER A. L. 2002. Doença de Chagas. In: Veronesi R & Focaccia R. *Tratado de Infectologia*. Ed. Atheneu, 2ª ed., P: 1195-1233.
91. FERREIRA R. C., IANNI B. M. ABEL L. C., BUCK P., MADY C., KALIL J. 2003. Increase plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/indeterminate and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(3): 407-411.
92. FERREIRA I. D., DO ROSÁRIO V. E., CRAVO P. V. 2006. Real-time quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, 5(1): 1.
93. FERRER-SUETA G. AND RADI R. 2009. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol*, 4: 161-177.
94. FIORENTINO D. F., ZLOTNIK A., MOSMANN T. R., HOWARD M., O'GARRA A. 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol*, 147: 3815-3822.
95. FLORES M. 1978. Control de los triatominos con hexaclorociclohexan en tres departamentos del sur del Perú. *Bol Of Sanit Panam*, v.84 (4), p: 324-331
96. FORNICIARI G., CASTAGNA M., VIACAVALA P., TOGNETTI A., ESTEVAN M., SEGURA E., BEVILACQUA G. 1992. Chagas disease in Peruvian Inca Mummy. *Lancet*, 339: 128-129.
97. FREIRE DE LIMA C. G., NASCIMENTO D. O., SOARES M. B., BOZZA P. T., CASTRO-FARIANETO H. C., DE MELLO F. G., *et al.*, 2000. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature*, 403: 199-203.
98. GARCIA E. S. AND AZAMBUJA P. 1991. Development and inter-actions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*, 8: 240-244.

99. GARCIA E. S. AND AZAMBUJA P. 1997. Infection of triatomines with *Trypanosoma cruzi*. In: CRAMPTON JM *et al.* (Eds), Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A Methods Manual. Chapman and Hall, p: 146-155.
100. GAUNT M. AND MILES M. 2000. The Ecotopes and Evolution of Triatomine Bugs (Triatominae) and their Associated Trypanosomes. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.95, p: 557-565.
101. GAZZINELLI R. T., OSWALD I. P., HIENY S., JAMES S., SHER A. 1992. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-argininedependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor, Eur. J. Immunol, 22: 2501-2506.
102. GENOIS M. M., PAQUET E. R., LAFFITTE M. C. N., MAITY R., RODRIGUE A., OUELLETTE M., MASSON J. Y. 2014. DNA repair pathways in trypanosomatids: from DNA repair to drug resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 78(1): 40-73.
103. GIAIMIS J., LOMBARD Y., MAKAYA-KUMBA M., FONTENEAU P., POINDRON P. 1992. A new and simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts. J Immunol Methods, 154(2): 185-93.
104. GIORDANO R., FOUTS D. L., TEWARI D., COLLI W., MANNING J. E., AND ALVES M. J. M. 1999. Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. Journal of Biological Chemistry, v. 274, p: 3461-3468.
105. GOERDT S. AND ORFANOS C. E. 1999. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. Immunity 10: 137-142.
106. GOES G. R., ROCHA P. S., DINIZ A. R., AGUIAR P. H., MACHADO C. R., VIEIRA L. Q. 2016. *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages.
107. GOLDEN J. M. AND TARLETON R. L. 1991. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. Experimental parasitology, 72(4): 391-402.
108. GOMES J. A., BAHIA-OLIVEIRA L. M., ROCHA M. O., MARTINS-FILHO O. A., GAZZINELLI G., CORREA-OLIVEIRA R. 2003. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. Infect Immun, 71(3): 1185-1193.
109. GONÇALVES DA COSTA S. C., CALABRESE K. S., ZAVERUCHA DO VALLE T., LAGRANGE P. H. 2002. *Trypanosoma cruzi*: infection patterns in intact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes. Histo Histopathol, 17(3): 837-844.
110. GONÇALVES R., VIEIRA E. R., MELO M. N., GOLLOB K. J., MOSSER D. M., TAFURI W. L. 2005. A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of *L. chagasi* to canine peritoneal macrophages. B.M.C. Infect. Dis, 5: 1-10.
111. GONZALEZ M. S., NOGUEIRA N. F. S., MELLO C. B., DE SOUZA W., SCHAUB G. A., *et al.*, 1999. Influence of Brain on the Midgut Arrangement and *Trypanosoma cruzi* Development in the Vector, *Rhodnius prolixus*. Exp Parasitol, 92: 100-108.

112. GONZALEZ M. S., SOUZA M. S., GARCIA E. S., NOGUEIRA N. F. S., MELLO C. B., *et al.*, 2013. *Trypanosoma cruzi* TeSMUG L-surface Mucins Promote Development and Infectivity in the Triatomine Vector *Rhodnius prolixus*. PLoS Negl Trop Dis, 7(11): e2552
113. GRAEFE S. E.; JACOBS T.; GAWORSKI I.; KLAUENBERG U.; STEEG C.; FLEISCHER B. 2003. Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to *Trypanosoma cruzi* in mice. Microbes. Infect, 5: 833-839.
114. GUERMONPREZ P., VALLADEAU J., ZITVOGEL L., THERY C. 2002. Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol, 20: 621-667.
115. HALL B. F. 1993. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry into host cell. Seminary in Cell Biology, v.4, p: 323-333.
116. HALL B. S., Pereira M. A., 2000a. Dual role for transforming growth factor beta-dependent signaling in *Trypanosoma cruzi* infection of mammalian cells. Infect. Immun, 68: 2077-2081.
117. HAVENGA M. J., VAN DAM B., GROOT B. S., GRIMBERGEN J. M., VALERIO D., BOUT A., QUAX P. H. 2001. Simultaneous detection of NOS-3 protein expression and nitric oxide production using a flow cytometer. Anal Biochem, 290: 283-291.
118. HERRER A. 1955. Trypanosomiasis americana en el Perú. III. Importancia del cobayo como reservorio de la enfermedad de Chagas en la región sudoccidental. Rev Peru Med Exp, 9(1-2): 45-55.
119. HIGUCHI M. L., DEBRITO T., MARTINS REIS M., BARBOSA A., BELLOTTI G., PEREIRA-BARRETO A. C., PILEGGI F. 1993. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. Cardiovasc Pathol, 2: 101-106.
120. HOFT D. F., YNCH L., KIRCHOFF. 1993. Kinetics analysis of antigen-specific immune response in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol, 151: 7038-7047.
121. HOLSCHER C., KOHLER G., MULLER U., MOSSMANN H., SCHAUB G. A., BROMBACHER F. 1998. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase, Infect. Immun, 66: 1208-1215.
122. HORTA M. F., MENDES B. P., ROMA E. H., NORONHA F. S. M., MACÊDO J. P., OLIVEIRA L. S., VIEIRA L. Q. 2012. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. Journal of parasitology research.
123. HSU M. P., MUHICH M., BOOTHROYD J. C. 1989. A developmentally regulated gene of trypanosomes encodes a homologue of rat protein disulfide isomerase and phosphoinositol-phospholipase C. Biochemistry, 28: 6440-6446.
124. HUNTER C. A., SLIFER T., ARAUJO F. G. 1996. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. Infect. Immun, 64: 2381-2386.

125. IRIGOÍN F., CIBILS L., COMINI M.A., WILKINSON S. R., FLOHÉ L., RADI R. 2008. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radic Biol Med*, 45: 733-42.
126. ISMAIL S. O., PARAMCHUK W., SKEIKY Y. A., REED S. G., BHATIA A., GEDAMU, L. 1997. Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*, 86(2): 187-197.
127. JONES E. M., COLLEY D. G., TOSTES S., LOPES E. R., VNENCAK-JONES C.L., MCCURLEY T. L. 1993. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48: 348-357.
128. KATAKURA T., MIYAZAKI M., KOBAYASHI M., HERNDON D. N., SUZUKI F. 2004. CCL17 and IL-10 as effectors that enable alternatively activated macrophages to inhibit the generation of classically activated macrophages. *J Immunol*, 172: 1407-1413.
129. KIPNIS T. L., CALICH V. L. G., DA SILVA W. D. 1979. Active entry of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* into macrophages. *Parasitology*, 78: 89-98
130. KLOETZEL J. K., MILDER R. V., UMEZAWA E. S. 1984. *Trypanosoma cruzi* interaction with macrophages: differences between tissue culture and bloodstream forms. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 26(4): 179-85.
131. KOO S. J., IMRAN H., CHOWDHURY, SZCZESNY B., WAN X., GARG N. J. 2016. Macrophages Promote Oxidative Metabolism to Drive Nitric Oxide Generation in Response to *Trypanosoma cruzi*.
132. KRAUTH-SIEGEL R. L., COMINI M. A. 2008. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1780: 1236-1248.
133. KREIER J. P., AL-ABBASSY S. N., SEED T. M. 1977. *Trypanosoma cruzi* surface change characteristics of cultured epimastigotas, tripomastigotas and amastigotas. *Revista do instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.19, p: 10-20.
134. LANGMEAD B., SALZBERG S. L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*, 9(4): 357-359.
135. LAUCELLA S. A., POSTAN M., MARTIN D., HUBBY FRALISH B., ALBAREDA M. C., ALVAREZ M. G., LOCOCO B., BARBIERI G., VIOTTI R. J., TARLETON R. L. 2004. Frequency of interferon-gamma -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis*, 289(5): 909-918.
136. LEY V., ANDREWS N. W., ROBBINS E. S., NUSSENZWEIG V. 1988. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med*, 168: 649-659.
137. LEWIS J. G., HAMILTON T., ADAMS D. O. 1986. The effect of macrophage development on the release of reactive oxygen intermediates and lipid oxidation products, and their ability to induce oxidative DNA damage in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 7(5): 813-818.
138. LI H., HANDSAKER B., WYSOKER A., *et al.* 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16): 2078-2079.

139. LOW H.P., PAULIN J.J., KEITH C.H. 1992. *Trypanosoma cruzi* infection of BSC-1 fibroblast cells causes cytoskeletal disruption and changes in intracellular calcium levels. *J Protozool*, 39: 463-470.
140. LOPES E. R., CHAPADEIRO E., DIAS J., COURA J. 1997. Anatomia patológica da doença de Chagas humana. Dias JCP, Coura JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas, uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Fiocruz, 67-84.
141. LUZ M. R. P., VAN LEUVEN F. AND ARAÚJO-JORGE T. C. 1994. Heterogeneity on the plasma levels of two acute phase proteins in mice from inbred strains during *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Research*, 80: 439- 441.
142. MACEDO A. M., MACHADO C. R., OLIVEIRA R. P., PENA S. D. 2004. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem I Oswaldo Cruz*, 99: 1-12
143. MACHADO F. S., MARTINS G. A., ALIBERTI J. C. S., MESTRINER F. L. A. C., CUNHA F.Q. 2000. *Trypanosoma cruzi* infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent NO-dependent trypanocidal activity. *Circulation*, v. 102, p: 3003-3008.
144. MACHADO C. A., AYALA F. J. 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 7396-7401.
145. MACHADO C. R., AUGUSTO-PINTO L., MCCULLOCH R., TEIXEIRA S. M. 2006. DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. *Mutat. Res*, 612: 40-57
146. MACRAE E. K., AND PRYZWANSKY K. B. 1984. Phagocytosis of zymosan by human neutrophils. *Carlsberg Research Commun*, 49: 315-322.
147. MALLINSON D. J., LACKIE J. M., COOMBS G. H. 1989. The oxidative response of rabbit peritoneal neutrophils to leishmanias and other trypanosomatids. *Int J Parasitol*, 19: 639-645.
148. MANTILLA J. C., ZAFRA G. A., MACEDO A. M., GONZÁLEZ C. I. 2010. Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. *Human pathology*, 41(4): 610-613.
149. MANTOVANI A., SICA A., SOZZANI S., ALLAVENA P., VECCHI A., LOCATI M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 25: 677-686.
150. MARCONCINI G. M. 2008. Urbanización de la enfermedad de Chagas: Encuesta sospecha. *Rev Argent Cardiol*, v.76 (2), p: 123-126.
151. MATEO H., MARÍN C., PÉREZ-CORDÓN G., SÁNCHEZ-MORENO M. 2008. Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103 (3): 271-276.
152. MENDOZA TICONA C. A., CÓRDOVA BENZAQUEN E., ANCCA JUÁREZ J., SALDAÑA DÍAZ J., TORRES CHOQUE A., VELÁSQUEZ TALAVERA R., *et al.*, 2005. Prevalencia de la enfermedad de Chagas en mujeres puérperas y transmisión congénita en un área endémica del Perú. *Rev Panam Salud Pública*, 17(3): 147-153.

153. MICHAILOWSKY V., SILVA N. M., ROCHA C. D., VIEIRA L. Q., LANNES-VIEIRA J., GAZZINELLI R. T. 2001. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *American Journal of Pathology*, 159: 1723-1733.
154. MICHAILOWSKY V., CELES M. R., MARINO A. P., SILVA A. A., VIEIRA L. Q., ROSSI M. A., SILVA J. S. 2004. Intercellular adhesion molecule 1 deficiency leads to impaired recruitment of T lymphocytes and enhanced host susceptibility to infection with *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Immunology*, 173(1): 463-470.
155. MILDER R. AND KLOETZEL J. 1980. The development of *Trypanosoma cruzi* in macrophages *in vitro*. Interaction with lysosomes and host cell fate. *Parasitology*, 80(1): 139-145.
156. MILES M. A., TOYE P. J., OSWALD S. C., GODFREY D. G. 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.71, p: 217-225.
157. MILES M. A., DE SOUZA A. A., POVOA M. M., SHAW J. J., LAINSON R., TOYÉ P. J. 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature*, 272: 819-821.
158. MILES M. A., LANHAM S. M., DE SOUZA A. A., POVOA M., 1980. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*, 74: 221-237.
159. MILES M. A., CEDILLOS R. A., POVOA M. M., DE SOUZA A. A., PRATA A. A., MACEDO V. 1981. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease? *Lancet*, 317: 1338-1340.
160. MINISTERIO DE SALUD. 1998. Doctrina, Normas y Procedimientos para el Control de la Tripanosomiasis o Enfermedad de Chagas en el Perú. Dirección General de Salud de las Personas. Programa de Con-trol de Malaria y otras enfermedades Metaxénicas. Lima. Perú.
161. MINOPRIO P., EL CHEIKH M. C., MURPHY E., HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M., COFFMAN R., COUTINHO A., O'GARRA A. 1993. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. *J Immunol*, 151(8): 4200-4208.
162. MOMEN H. 1999. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94(Sup. 1): 181-184.
163. MONCAYO A. 2003. Chagas disease: current Epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.98, n.5, p: 577-591.
164. MONGE C. 1914. Trabajo de Concurso para la Cátedra de Historia Natural Médica, de la Facultad de Medicina de Lima.

165. MOREL C., CHIARI E., CAMARGO E. P., MATTEI D. M., ROMANHA A. J., SIMPSON L. 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.77, p: 6810-6814.
166. MOSMANN T. R., CHERWINSKI H., BOND M. W., GIEDLIN M. A., COFFMAN R. L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol, 136: 2348-2357.
167. MUÑOZ-FERNÁNDEZ M. A., FERNÁNDEZ M. A., FRESNO M. 1992. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF- α and IFN- γ through a nitric oxide-dependent mechanism. Immunology letters, 33(1): 35-40.
168. MURPHY C. A., LANGRISH C. L., CHEN Y., BLUMENSCHNEIN W., MCCLANAHAN T., KASTELEIN R. A., SEDGWICK J. D., CUA D. J. 2003. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. J Exp Med, 198: 1951-1957.
169. MURTA S.M.F., ROMANHA A.J. 1999. Characterization of *Trypanosoma cruzi* Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 94, Suppl. I: 177-180.
170. NÁQUIRA C. AND CABRERA R. 2009. Breve reseña histórica de la enfermedad de Chagas, a cien años de su descubrimiento y situación actual en el Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 26(4): 494-504.
171. NÁQUIRA C. 2014. Urbanización de la enfermedad de Chagas en el Perú: experiencias en su prevención y control. Rev Peru Med Exp Salud Pública, 31(2): 343-347.
172. NATHAN C. AND SHILOH M. U. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(16): 8841-8848.
173. NEIRA I., FERREIRA A. T., YOSHIDA N. 2002. Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. Int. J. Parasitol., v.32, p: 405-414.
174. NAVILIAT M., GUALCO G., CAYOTA A., RADI, R. 2005. Protein 3-nitrotyrosine formation during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Brazilian journal of medical and biological research, 38(12): 1825-1834.
175. NOGUEIRA N. AND COHN Z. 1976. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. J. Exp. Med, 143: 1402-1420.
176. OLIVEIRA A. C., PEIXOTO J. R., DE ARRUDA L. B., CAMPOS M. A., GAZZINELLI R. T., GOLENBOCK D. T., *et al.*, 2004. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. J. Immunol, 173: 5688-5696.

177. OUAISSI M. A., CORNETTE J., AFCHAIN D., CAPRON A., GRAS-MASSE H., TARTAR A. 1986. *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain, *Science*, v. 234, p: 603-607.
178. OSAKI T., UCHIDA Y., HIRAYAMA J., NISHINA H. 2011. Diphenyleneiodonium chloride, an inhibitor of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, suppresses light-dependent induction of clock and DNA repair genes in zebrafish. *Biol Pharm Bull*, 34: 1343-1347.
179. PAIVA C. N., FEIJÓ D. F., DUTRA F. F., CARNEIRO V. C., FREITAS G. B., ALVES L. S., MESQUITA J., FORTES G. B., FIGUEIREDO R. T., SOUZA H. S., FANTAPPIÉ M. R., LANNES-VIEIRA J., BOZZA M. T. 2012. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice, *J. Clin. Invest.* 122: 2531–2542.
180. PAIVA C. N. AND BOZZA M. T. 2014. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? *Antioxid. Redox Signal*, 20: 1000-1037.
181. PARODI-TALICE A. *et al.* 2007. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *J Mass Spectrom*, 42 (11): 1422-1432.
182. PEARSON R. D. AND STEIGBIGEL R. T. 1981. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of Immunology*, 127(4): 1438-1443.
183. PELUFFO G., PIACENZA L., IRIGOÍN F., ALVAREZ M.N., RADI R. 2004. L-arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Trends Parasitol*, 20(8): 363-369.
184. PETRAY P., ROTTENBERG M. E., GRINSTEIN S., ÖRN A. 1994. Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology*, 16: 193-199.
185. PIACENZA L., PELUFFO G., ALVAREZ M. N., KELLY J. M., WILKINSON S. R., RADI R. 2008. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem J*, 410(2): 359-368.
186. PIACENZA L., ALVAREZ M. N., PELUFFO G., RADI R. 2009. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Curr Opin Microbiol*, 12(4): 415-421.
187. PIACENZA L. *et al.*, 2013. *Trypanosoma cruzi* Antioxidant Enzymes as Virulence Factors in Chagas Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(7): 723-734.
188. PIÑEYRO M. D., PARODI-TALICE A., ARCARI T., ROBELLO C. 2008. Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease?. *Gene*, 408(1): 45-50.
189. PIRON M., FISA R., CASAMITJANA N., LOPEZ-CHEJADE P., PUIG L., VERGE S M., *et al.*, 2007. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop*, 103: 195-200.
190. PIZZI T., AGOSÍN M., CHRISTEN R., HOECKER G., NEGhme A. 1948. Influencia de la constitucion genetica en la resistencia de la laucha a la infeccion experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Biologica*, 11: 43-53.

191. PLATA F., GARCIA-PONS F., WIETZERBIN J. 1987. Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma *in vivo*. In *Annales de l'Institut Pasteur/Immunologie*, v. 138, p: 397-415.
192. POSTAN M., MCDANIEL J. P. AND DVORAK J. A. 1984. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. II. Course of infection of C57BL/6 mice with single-cell-isolated stocks. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 33: 236-238.
193. POSTAN M., BAILEY J. J., DVORAK J. A., MCDANIEL J. P. AND POTTALA E. W. 1987a. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. III. Histopathological and electrocardiographical responses to chronic infection. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 37: 541-549.
194. PUFAHL R. A., NANJAPPAN P. G., WOODARD R. W. *et al.*, 1992. Mechanistic probes of N-hydroxylation of L-arginine by the inducible nitric oxide synthase from murine macrophages. *Biochemistry*, 31: 6822-6828.
195. RASSI A., RASSI Jr. A., RASSI G. G. 2000. Fase aguda. In *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p: 231-245.
196. REED S. G., INVERSO J. A. ROTERS S. B. 1984. Suppressed antibody responses to sheep erythrocytes in mice with chronic *Trypanosoma cruzi* infections are restored with interleukin 2. *Journal of Immunology*, 133: 3333-3337.
197. REED S. G., BROWNELL C. E., RUSSO D. M., SILVA J. S., GRABSTEIN K. H., MORRISSEY P. J. 1994. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology*, 153: 3135-3140.
198. REIS G. A. AND LOPES M. F. 2000. A resposta imune à ecção pelo *Trypanosoma cruzi* em modelos experimentais. In: Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p: 153-169.
199. REIS-CUNHA J. L., RODRIGUES-LUIZ G. F., VALDIVIA H. O., BAPTISTA R. P., MENDES T. A., DE MORAIS G. L., LOPEZ C. T. 2015. Chromosomal copy number variation reveals differential levels of genomic plasticity in distinct *Trypanosoma cruzi* strains. *BMC genomics*, 16(1): 499.
200. REIS MACHADO J., SILVA M. V., BORGES D. C., DA SILVA C. A., RAMIREZ L. E., DOS REIS M. A., RODRIGUES D. B. R. 2014. Immunopathological aspects of experimental *Trypanosoma cruzi* reinfections. *BioMed research international*.
201. RIBEIRÃO M., PEREIRA-CHIOCCOLA V. L., RÉNIA L., AUGUSTO FRAGATA FILHO A., SCHENKMAN S., RODRIGUES M. M. 2000. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite Immunol*, 22(1): 49-53.
202. ROCHA M. O. C., RIBEIRO A. L. P., TEIXEIRA M. M. 2003. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front Biosci*, 8: e44-e54.
203. RODRIGUEZ A., SAMOFF E., RIOULT M. G., CHUNG A., ANDREWS N. W. 1996. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *Journal of Cell Biology*, 134(2): 349-362.

204. RODRIGUES C. M., VALADARES H. M. S., FRANCISCO A. F., ARANTES J. M., CAMPOS C. F., *et al.*, 2010. Coinfection with Different *Trypanosoma cruzi* Strains Interferes with the Host Immune Response to Infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(10): e846.
205. ROFFÊ E., ROTHFUCHS A. G., SANTIAGO H. C., MARINO A. P. M., RIBEIRO-GOMES F. L., ECKHAUS M., MURPHY P. M. 2012. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Immunology*, 188(2): 649-660.
206. ROGGERO E., PEREZ A., TAMAEEKAKAZU M., PIAZZON I., NEPOMNASCHY I., WIETZERBIN J., BOTTASSO O. 2002. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. *Clinical & Experimental Immunology*, 128(3): 421-428.
207. ROTTENBERG M. E., RIARTE A., SPORRONG L., ALTECHEH J., PETRAY P., RUIZ A. M., WIGZELL, ORN A. 1995. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. *Immunol Letters*, 45: 53-60.
208. SÁNCHEZ S. Y., VELÁSQUEZ T. R., VÁSQUEZ H. L., CÓRDOVA B. E., DELGADO D. F., BALLÓN E. J., ZEVALLOS G. J. 2007. Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* y factores asociados en población adulta en una zona de alta endemicidad de Arequipa, Perú. *Acta Médica Peruana*, 24(1): 22-26.
209. SAKAGUCHI S., ONO M., SETOGUCHI R., YAGI H., HORI S., FEHERVARI Z., SHIMIZU J., TAKAHASHI K., NOMBRA T. 2006. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease *Immunol. Revs*, 212: 8-27
210. SHAMES S. L., FAIRLAMB A. H., CERAMI A., WALSH C. T. 1986. Purification and characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*, a newly discovered member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases. *Biochemistry*, 25(12): 3519-3526.
211. SILVA J. S., MORRISSEY P. J., GRAVSTEIN K. H., MOHLER K. M., ANDERSON D., REED S. G., 1992. Interleukin-10 and interferon-regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection, *J. Exp. Med.*, 175: 169-174.
212. SILVA J. S., VESPA G. N., CARDOSO M. A., ALIBERTI J. C., CUNHA F. Q. 1995. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected-gamma interferon-activated macrophages. *Infect. Immun.*, v.63, p: 4862-4867.
213. SILVA J. S., MACHADO F. S., MARTINS G. A. 2003. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front Biosci*, 8: S314-S325.
214. SOUTO R. P., FERNANDES O., MACEDO A. M., CAMPBELL D. A., ZINGALES B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.3, p: 141-152.
215. STEINDEL M.; DIAS NETO E.; MENEZES C. L. P.; ROMANHA A. J.; SIMPSON A. J. G. 1993. Random Amplified Polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Molecular Biochemical Parasitology*, v.60, p: 71- 80.

216. STORINO R. AND MILEI J. 1994. Introducción. Enfermedad de Chagas, Storino R, Milei J. Ed. Mosby-Doyma Argentina, Buenos Aires. Cap. 1: 1-7.
217. STRIJDOM H., MULLER C. LOCHNER A. 2004. Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *J.Mol.Cell Cardiol.*, 37: 897-902.
218. TAKEUCHI K., UMEKI Y., MATSUMOTO N., YAMAMOTO K., YOSHIDA M., SUZUKI K., ARATANI Y. 2012. Severe neutrophil-mediated lung inflammation in myeloperoxidase-deficient mice exposed to zymosan. *Inflamm. Res.*, 61: 197-205.
219. TALVANI A., RIBEIRO C.S., ALIBERTI J. S. C. 2000. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous INF-gama as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and Infection*, v. 2, p: 851-866.
220. TALVANI A., ROCHA M.O., COGAN J., MAEWAL P., DE LEMOS J., RIBEIRO A.L., TEIXEIRA M.M. 2004. Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in chagasic cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 99(6): 645-649.
221. TARLETON R. L. 1995. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. *Parasitol today*, 11: 7-9.
222. TARLETON R. L. AND ZHANG L. 1999. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol today*, 15: 94-99.
223. TEXEIRA A., SADI P., REBELOJ., ALGAÑARAZ E., VIEIRA D., LAURIA-PIRES L., NASCIMENTO R., VEXENANT C., SILVA A., AULT S., COSTA J. 2001. Emerging Chagas Disease: Trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Emerg. Infect. Dis.*, 1: 100-112.
224. TEXEIRA A. R., NASCIMENTO R. J., STURM N. R. 2006. Evolution and pathology in Chagas disease, a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.101, n.5, p: 463-491.
225. TELLERIA J., LAFAY B., VIRREIRA M., BARNABÉ C., TIBAYREBC M., SVOBODA M. 2006. *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Experimental parasitology*, v.114, p: 279-288.
226. THOMSON L., GADELHA F. R., PELUFFO G., VERCESI A. E., RADI R. 1999. Peroxynitrite affects Ca²⁺ transport in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 98: 81-91.
227. THOMSON L., DENICOLA A., RADI R. 2003. The trypanothione-thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Arch. Biochem. Biophys.* 412: 55-64.
228. TIBAYRENC M. AND AYALA F. J. 1987. High correlation between isoenzyme classification and kinetoplast DNA variability in *Trypanosoma cruzi*. *C. R. Acad. Sci. III*, 304: 89-92.
229. TIBAYRENC M. AND AYALA F. J. 1988. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution*, 42: 277-292.

230. TIBAYRENC M. 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int. J. Parasitol.*, 28: 85-104.
231. TORRICO F., HEREMANS H., RIVERA M.T., VAN M. E., BILLIAU A., CARLIER Y. 1991. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice, *J. Immunol.*, 146: 3626-3632.
232. TURRENS J. F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.*, 552: 335-44.
233. TURRENS J. F. 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol. Aspects of Medicine*, 25: 211-220.
234. UBEDA J. M., LÉGARÉ D., RAYMOND F., OUAMEUR A. A., BOISVERT S., RIGAUULT P. OUELLETTE M. 2008. Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. *Genome biology*, 9(7): R115.
235. UCHIDA K., MISHIMA S., OHTA S., YUKIOKA T. 2007. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates lung injury in rats after gut ischemia-reperfusion. *J. Trauma*, 63: 603-607.
236. UNKELESS J. C., GORDON S., REICH E. 1974. Secretion of plasminogen activator by stimulated macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, 139(4): 834-850.
237. URBINA J. A. 2010. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta tropica*, 115: 55-68.
238. VAGO A. R., MACEDO A. M., OLIVEIRA R. P., ANDRADE L. O., CHIARI E., ALVÃO L. M. C., SIMPSON A. J. G., TOSTES S., PENA S. D. J. 1996. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *The American Journal of Pathology*, v.149, p: 2153-2159.
239. VALENZUELA L., BARRÍA C., SEPÚLVEDA S., GALANTI N., CABRERA G. 2010. Enfermedad de Chagas crónica: Estrés oxidativo y miocarditis chagásica asociada a la persistencia parasitaria. *Av. Cs. Vet.*, v.25, p: 35-44.
240. VARGAS VÁSQUEZ F. R. 2005. Epidemiología molecular de la Trypanosomiasis americana (*Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*) en la región norte y nororiental del Perú. [Tesis Doctoral]. Granada: Facultad de Ciencias, Universidad de Granada.
241. VASCONCELOS R. M., LEITE F.C., LEITE J. A., RODRIGUES MASCARENHAS S., RODRIGUES L. C., PIUVEZAM M. R. 2012. Synthesis, acute toxicity and anti-inflammatory effect of bornyl salicylate, a salicylic acid derivative. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 34: 1028-1038.
242. VEGA S. AND NÁQUIRA C. 2006. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la trypanosomiosis americana (enfermedad de Chagas). 2da ed. Serie de Normas Técnicas N.º 26. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.
243. VERANI J. R., SEITZ A., GILMAN R. H., LA FUENTE C., GALDOS-CARDENAS G., KAWAI V., *et al.*, 2009. Geographic variation in the sensitivity of recombinant antigen-based rapid tests for chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 80 (3): 410-415.
244. WELSH J. AND MCCLELLAND M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213_7218.

245. WILKINSON S. R., TEMPERTON N. J., MONDRAGON A., KELLY J. M. 2000. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.*, 275: 8220-8225.
246. WILKINSON S. R. *et al.*, 2002a. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. *J. Biol. Chem.*, 277: 17062-17071.
247. WILKINSON S. R., *et al.* 2002b. TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.*, 364: 787-794.
248. WILKINSON S. R., OBADO S.O., MAURICIO I.L., KELLY J.M. 2002c. *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 13453-13458.
249. WILLIAMS J. G., KUBELIK A. R., LIVAK K. J., RAFALSKI J. A., TINGEY S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531-6535.
250. WIRTH J. J., KIERSZENBAUM F., SONNENFELD G., ZLOTNIK A. 1985. Enhancing effects of gamma interferon on phagocytic cell association with and killing of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, 49(1): 61-66.
251. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2002. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. Geneva: WHO; Technical Report Series 905.
252. WRIGHTSMAN R., KRASSNER S., WATSON J. 1982. Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing the parasitemia and survival. *Infection & Immunity*, 36: 637-644.
253. YOSHIDA N. 2006. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 78(1): 87-111.
254. YOSHIDA N. AND CORTEZ M. 2008. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. *Sub-Cellular Biochemistry*, v. 47, p: 82-91.
255. ZELEDON R. 1974. Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas disease. *Ciba Foundation Symp*, 20: 51-77
256. ZHANG L. AND TARLETON R.L. 1996. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Exp Parasitol.*, 84(2): 203-213.
257. ZINGALES B., SOUTO R. P., MANGIA R. H., LISBOA C. V., CAMPBELL D. A., COURA J. R., JANSEN A., FERNANDES O. 1998. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based dimorphisms of rRNA and miniexon gene sequences. *International Journal for Parasitology*, v.28, n.1, p: 105-112.

258. ZINGALES B., ANDRADE S. G., BRIONES M. R. S., CAMPBELL D. A., CHIARI E., FERNANDES O., GUHL F., LAGES-SILVA E., MACEDO A. M., MACHADO C. R., MILES M. A., ROMANHA A. J., STURM N. R., TIBAYRENC M., SCHIJMAN G. A. 2009. New consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.104, p: 1051-1054.
259. ZÚÑIGA C., PARRA A., VELA H., COURCELLES T., VARGAS R., VERGARA U. 1998. Estudio histopatológico en ratones infectados en forma experimental con *Trypanosoma cruzi*. Parasitol, Día 22: 23-28.
260. ZÚÑIGA C., CEPEDA R., PALÁU M.T., VERA A., MEJÍA J., VERGARA U. 2007. Efecto protector de una cepa no virulenta contra la infección con una cepa virulenta de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino. Arch. Med. Vet., v. 39, (1): 77-82.