



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**



**MARINA FERREIRA BATISTA**

**Estudo do perfil de ativação da via MAPK em células Hela induzido por  
formas Amastigotas Extracelulares (AEs) das cepas G e CL de  
*Trypanosoma cruzi***

**Belo Horizonte**

**2019**

**MARINA FERREIRA BATISTA**

**Estudo do perfil de ativação da via MAPK em células Hela induzido por  
formas Amastigotas Extracelulares (AEs) das cepas G e CL de  
*Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral para a obtenção de título de Mestre em Genética na área de Genética Molecular, de Microrganismos e Biotecnologia.

Orientador (a): Dra. Diana Bahia

**Belo Horizonte**

**2019**

*“Não é preciso saber tudo, mas é fundamental estar  
cercado por pessoas que sabem.”*

*Carmem Miranda*

043      Batista, Marina Ferreira.  
            Estudo do perfil de ativação da via MAPK em células Hela induzido por formas Amastigotas Extracelulares (AEs) das cepas G e CL de *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / Marina Ferreira Batista. – 2019.

95 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Diana Bahia.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução.

1. Genética. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Sistema Imunitário. 4. Amastigotas - Teses. 5. Quinases de Proteína Quinase Ativadas por Mitógeno. I. Bahia, Diana. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título

CDU: 575

## Agradecimentos

À Dra. Diana Bahia, minha orientadora, por todas as oportunidades oferecidas, pelos ensinamentos, orientações e confiança depositada em mim que foram essenciais para a conclusão dessa etapa.

Aos colaboradores, imprescindíveis ao desenvolvimento deste estudo, Dra. Daniella Bartholomeu e Dr. Ricardo Fujiwara do Departamento de Parasitologia (UFMG) e ao Dr. Cláudio Silva da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

À Dra. Santuza Teixeira e sua equipe de pesquisa, pela disponibilidade e apoio.

Ao Marlus, Ana Laura e Mariana por todo apoio intelectual e técnico para que esse trabalho fosse realizado da melhor maneira possível.

Aos meus colegas do Laboratório de Sinalização Celular pelos momentos compartilhados e pelas experiências trocadas. Em especial, a Isabela e ao Carlos, por terem sido uma grande parceria durante esse trabalho nos momentos de descontração, crescimento e dificuldades e pela amizade sincera construída durante esses anos.

Ao Laboratório de Genômica de Parasitos (LIGP) e às técnicas Michele e Vanessa, por me acolherem durante meu mestrado.

Aos membros da banca Dra. Mariana Cardoso, Dr. Aristóboles Silva e Dr. Frederico Soriani por aceitarem participar e contribuir criticamente para a conclusão desse trabalho.

Às agências financiadoras FAPEMIG, FAPESP, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro sem os quais seria impossível iniciar e concluir esse projeto.

Aos amigos, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Genética e aos funcionários do Instituto de Ciências Biológicas.

Aos amigos de Ouro Preto, por serem uma família, independentemente de onde estejam.

Aos amigos de Belo Horizonte e feitos aqui, obrigada por me receberem tão bem nessa cidade e as minhas colegas de apartamento, Débora e Vanessa, pela paciência e pelos conselhos.

A Deus, por nunca ter me abandonado, mesmo nos momentos em que me senti incapaz, que o Senhor me ilumine hoje e sempre.

Aos meus pais Sônia e Maurício, e ao meu irmão, Meydson por confiarem no meu potencial e nas minhas decisões, sempre me apoiando e desejando o melhor para o meu futuro. Amo vocês incondicionalmente.

Às minhas avós, Virgínia e Custódia (*in memoriam*), exemplos de vida a serem seguidos, obrigada pelos mimos e abraços nas horas difíceis.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

## Sumário

Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xi
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
1. Introdução.....	1
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> e Doença de Chagas.....	1
1.2. Amastigotas Extracelulares, uma forma alternativa de manutenção da infecção de <i>T. cruzi</i> .....	5
1.3. Proteínas quinases (PK).....	9
1.4. Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPK).....	11
1.5. Resposta Imune mediada por patógenos e via MAPK.....	14
2. Objetivos.....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. Metodologia.....	18
3.1. Culturas celulares.....	18
3.1.1. Cultivo de células HeLa.....	18
3.1.2. Cultivo de células Vero.....	18
3.2. Obtenção de parasitas.....	18
3.3. Ensaios de citotoxicidade.....	19
3.4. Ensaios de Invasão.....	20
3.5. Ensaios de Sinalização para Western Blot.....	21
3.6. Eletroforese em gel e Western Blot.....	21
3.7. Seleção de citocinas e fatores de transcrição.....	23
3.8. Desenho de iniciadores para PCR quantitativo (qPCR).....	24
3.9. Ensaio de sinalização para PCR em tempo real (RT-PCR).....	24
3.10. Síntese de cDNA.....	25
3.11. Reação de Cadeira de Polimerase - PCR Convencional.....	25
3.12. Reação de Cadeira de Polimerase em tempo real (RT-PCR).....	26
3.13. Análises Estatísticas.....	28

4. Resultados.....	29
4.1. Citotoxicidade dos inibidores.....	29
4.2. Efeitos da inibição da via MAPK durante a invasão de amastigotas extracelulares (AEs) das cepas G e CL.....	31
4.3. Cinética de ativação de proteínas quinases da via MAPK induzida por amastigotas extracelulares (AEs) das cepas G e CL.....	37
4.4. Análise da expressão de citocinas e fatores de transcrição por amastigotas extracelulares (AEs) das cepas G e CL-PCR convencional e qPCR.....	53
5. Discussão.....	57
6. Perspectivas.....	66
7. Conclusão.....	66
8. Referências.....	67
9. Anexos.....	79
Anexo I – Curvas de dissociação (RT-PCR).....	79

## Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
Figura 2. Polimerização de actina induzida por formas AEs de <i>Trypanosoma cruzi</i> da cepa G na superfície de célula Hela analisada por microscopia eletrônica de varredura.....	5
Figura 3. Modelo de sinalização de formas AEs durante o processo de invasão proposto por Ferreira e colaboradores (2012).....	8
Figura 4. Via de sinalização de MAPK simplificada.....	13
Figura 5. Viabilidade celular após tratamento com inibidores.....	30
Figura 6. Efeitos da inibição da MAPK p38 no número de amastigotas extracelulares (AEs) internalizados da cepa CL e G.....	32
Figura 7. Efeitos da inibição da MAPK ERK1/2 e da MAP2K MEK1 no número de amastigotas extracelulares (AEs) internalizados da cepa CL e G.....	33
Figura 8. Efeitos da inibição da MAPK ERK1/2 no número de amastigotas extracelulares (AEs) internalizados da cepa CL e G.....	34
Figura 9. Efeitos da inibição da MAPK JNK no número de amastigotas extracelulares (AEs) internalizados da cepa CL e G.....	35
Figura 10. Efeitos da inibição do receptor de crescimento epidermal (EGFR) no número de amastigotas extracelulares (AEs) internalizados da cepa CL e G.....	36
Figura 11. Indução da fosforilação da proteína p38, pertencente a via MAPK, por formas AEs da cepa CL de <i>T. cruzi</i> .....	38
Figura 12. Indução da fosforilação da proteína p38, pertencente à via MAPK, por formas AEs da cepa G de <i>T. cruzi</i> .....	39
Figura 13. Indução da fosforilação da proteína ERK1/2, pertencente à via MAPK, por formas AEs da cepa CL de <i>T. cruzi</i> .....	40
Figura 14. Indução da fosforilação da proteína ERK1/2, pertencente a via MAPK, por formas AEs da cepa G de <i>T. cruzi</i> .....	41
Figura 15. Indução da fosforilação da proteína MEK1/2, pertencente a via MAPK, por formas AEs da cepa CL de <i>T. cruzi</i> .....	43

Figura 16. Indução da fosforilação da proteína MEK1/2, pertencente a via MAPK, por formas AEs da cepa G de <i>T. cruzi</i> .....	44
Figura 17. Indução da fosforilação da proteína MKP1, fosfatase que age sobre p38, por formas AEs da cepa CL de <i>T. cruzi</i> .....	45
Figura 18. Indução da fosforilação da proteína MKP1, fosfatase que age sobre p38, por formas AEs da cepa G de <i>T. cruzi</i> .....	46
Figura 19. Indução da fosforilação da proteína serina/treonina quinase Akt e do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) por formas AEs da cepa CL de <i>T. cruzi</i> .....	48
Figura 20. Indução da fosforilação da proteína serina/treonina quinase Akt por formas AEs da cepa G de <i>T. cruzi</i> .....	49
Figura 21. Indução da fosforilação do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) por formas AEs da cepa G de <i>T. cruzi</i> .....	50
Figura 22. Indução da fosforilação da proteína tirosina quinase SRC por formas AEs da cepa CL de <i>T. cruzi</i> .....	51
Figura 23. Indução da fosforilação da proteína tirosina quinase SRC por formas AEs da cepa G de <i>T. cruzi</i> .....	52
Figura 24. Análise da expressão de TNF- $\alpha$ por formas AEs das cepas CL e G de <i>T. cruzi</i> .....	53
Figura 25. Análise da expressão de TGF- $\beta$ por formas AEs das cepas CL e G de <i>T. cruzi</i> .....	54
Figura 26. Análise da expressão de IL-6 por formas AEs das cepas CL e G de <i>T. cruzi</i> .....	55
Figura 27. Análise da expressão de ELK1 por formas AEs das cepas CL e G de <i>T. cruzi</i> .....	56
Figura 28. Análise da expressão de cFOS por formas AEs das cepas CL e G de <i>T. cruzi</i> .....	56
Figura 29. Modelo de sinalização proposto durante a invasão por formas amastigotas extracelulares (AEs) da cepa CL.....	64
Figura 30. Modelo de sinalização proposto durante a invasão por formas amastigotas extracelulares (AEs) da cepa G.....	65

**Lista de tabelas**

Tabela 1. Inibidores, seus alvos e concentrações de uso padronizadas, segundo indicações do manual do fabricante Cayman Chemical®.....	20
Tabela 2. Anticorpos Primários utilizados durante a etapa de Western Blot.....	23
Tabela 3. Mistura (Mix) para a Reação de Cadeia de Polimerase (PCR).....	25
Tabela 4. Condições estabelecidas para Reação de Cadeira de Polimerase (PCR).....	26
Tabela 5. Características dos iniciadores utilizados para experimentos de Reação de Cadeira de Polimerase em tempo real.....	27

**Lista de abreviaturas e siglas**

AEs – Amastigotas extracelulares

AI – Amastigotas intracelulares

AKT – proteína quinase B

DTU – Discrete typing unit

EGF – Fator de crescimento epidérmico

EGFR – Receptor de fator de crescimento epidérmico

ERK1/2 - Quinases reguladas por estímulos extracelulares

EPI – Epimastigotas

Glu – ácido glutâmico

Gly – glicina

GPCR – receptor acoplado a proteína G

IgG - imunoglobulina isotipo G

IL – Interleucina

JNK 1/2/3 – c-JUN N-terminal Kinase

LIT – Liver Infusion Tryptose

MAPK – Mitogen-activated protein kinases

MOI – Multiplicity of Infection

PAMPs – padrões de reconhecimento associados a patógenos

PBST – PBS Tween 0,1%

PK – Protein Kinase

PRRs – receptores de padrões moleculares

Pro – prolina

R.P.M.I - Roswell Park Memorial Institute

R0 – Meio RPMI sem soro

RSK – Ribosomal s6 kinase

RTK – Receptor proteína quinase

SFB – Soro Fetal Bovino

SRC – Sarcoma quinase

TBST – TBS Tween 0, 01%

TCT – Tripomastigotas de cultura de tecidos

Th1 – Resposta imune celular tipo 1

Th2 – Resposta imune celular tipo 2

Thr – Treonina

TLRs – receptores toll- like

Tm = temperatura de anelamento

TS – Tripomastigotas Sanguíneos

Tyr – Tirosina

## Resumo

### **Título: Estudo do perfil de ativação da via MAPK em células HeLa induzido por formas Amastigotas Extracelulares (AEs) das cepas G e CL de *Trypanosoma cruzi***

*Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas que afeta cerca de 7 milhões de pessoas, induz a ativação da via MAPK durante a invasão celular, favorecendo sua entrada e sobrevivência. Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) fosforilam resíduos de serina e treonina presentes em seus substratos para ativar ou desativar seu alvo. MAPK é uma das formas de comunicação entre um estímulo externo mediado por patógenos e a formação da resposta imune. Existem três vias de MAPK bem conhecidas em células de mamíferos: ERK1/2 - ativado por fatores de crescimento, hormônios e estímulos pró-inflamatórios, c-JUN quinase N-terminal (JNK1 / 2/3) e p38 MAPK ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$ ) - ativada por estresses celulares e ambientais, além de estímulos pró-inflamatórios. Essas vias medeiam a formação da resposta imune através da ativação de diferentes proteínas e consequente síntese de citocinas/interleucinas inflamatórias e anti-inflamatórias. Amastigotas extracelulares (AEs), uma forma infecciosa alternativa de *T. cruzi*, são prematuramente liberadas de células infectadas ou geradas pela diferenciação extracelular de formas tripomastigotas. Os AEs da cepa G são mais infectivos que os AEs da cepa CL. O presente estudo teve como objetivo elucidar o perfil de ativação da via de MAPK em células HeLa mediado pela invasão de formas AEs de *T. cruzi* das cepas G e CL e seu possível efeito na modulação da resposta imune do hospedeiro *in vitro*. Foi observado em experimentos utilizando inibidores para quinases dessa via que ERK1/2, EGFR e p38 apresentam uma tendência na redução da taxa de invasão de AEs da cepa G. AEs de cepa G induziram uma fosforilação bifásica da via MEK-ERK, possivelmente devido à maior infectividade apresentada por essa cepa. Ainda, é possível que o receptor de EGF (EGFR) seja ativado em processos iniciais de invasão celular, nos momentos de adesão, e logo após seja desativado, fato possivelmente explicado pelo sequestro de EGF pelo parasito. AEs da cepa CL induziram a expressão de IL-6, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ . Já AEs da cepa G levaram à produção das interleucinas/citocinas IL-6, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  e do fator de transcrição cFOS. A compreensão inicial de como essa via é ativada por patógenos é uma importante forma de abrir possibilidades para futuros estudos, principalmente visando relacionar essa via a diferentes morfologias de *Trypanosoma cruzi* de cepas com maior importância clínica em humanos.

**Palavras chave:** *Trypanosoma cruzi*; amastigotas extracelulares (AEs); sistema imune, MAPKs.

## Abstract

### **Title: Map kinase (MAPK) activation profiling induced in HeLa cells by extracellular amastigotes (EAs) of G and CL strains of *Trypanosoma cruzi***

*Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas Disease, which affects about 7 millions people induces MAPK pathway activation during cell invasion, favoring its entry and survival. Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) phosphorylate their substrates at serine and threonine residues sites to activate or de-activate their target. There are three well-known MAPK pathways in mammalian cells: ERK1/2 – activated by growth factor, hormones and proinflammatory stimuli -, c-JUN N-terminal kinase (JNK1/2/3), and p38 MAPK ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , and  $\gamma$ ) - activated by cellular and environmental stresses, in addition to proinflammatory stimuli. These pathways mediate the immune response formation through activation of different proteins and consequent synthesis of inflammatory and anti-inflammatory cytokines/interleukins. Extracellular Amastigotes (EAs), an infectious alternative form of *T. cruzi*, are prematurely released from infected cells or generated by extracellular differentiation of trypomastigote forms. EAs of G strain are more infective than EAs of CL strain. The present study aimed to elucidate the activation profile of MAPK pathway in HeLa cells mediated by the invasion of *T. cruzi* EAs of G and CL strains and the possible effects on host immune response modulation *in vitro*. In experiments using MAPK inhibitors, ERK1/2, EGFR and p38 inhibitors seemed to reduce the invasion rate of EAs of G strain. EAs of G strain induced a biphasic phosphorylation of MEK-ERK pathway, possibly due to its higher infectivity. Furthermore, it is possible that EGF receptor (EGFR) is activated in early phases of cell invasion, at adhesion time, and deactivated soon after adhesion, possibly explained by parasite EGF sequestration. CL EAs induced expression of IL-8, IL-6 and TNF- $\alpha$ . EAs of G strain activated the production of interleukins/cytokines IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  and cFOS transcription factor. To understand how this pathway is activated by pathogens is crucial to broaden possibilities for future studies, mainly relating this pathway to *Trypanosoma cruzi* evolutive forms of different strains with greater clinical importance in humans.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*; extracellular amastigotes (EAs); immune system; MAPKs.

## 1. Introdução

### 1.1. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas

A Doença de Chagas, descoberta em 1909 pelo médico sanitário Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, tem como agente causador o parasita *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909), um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (BRENER, 1997).

É considerada uma doença negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) sendo endêmica em 21 países da América Latina, exceto nas Ilhas do Caribe (OMS, 2017). Porém, desde as últimas décadas, vem sendo detectada em diferentes localidades como: Estados Unidos, Canadá, países da Europa e países do Pacífico Leste devido ao alto fluxo de circulação de pessoas entre continentes levando a novos contextos epidemiológicos, econômicos e sociais na distribuição da doença (SCHMUNIS; YADON, 2010). Estima-se cerca de 6 a 7 milhões de pessoas contaminadas com *T. cruzi* em escala mundial (OMS, 2017).

A transmissão da doença pode ocorrer pela forma clássica, resultante da penetração de parasitas presentes nas fezes de triatomíneos através de lesão tecidual causada pelo inseto ao se alimentar (“chagoma” e “Sinal de Romanã”), por transfusões de sangue contaminado, de forma congênita e por via oral através de alimentos contaminados com formas metacíclicas (caldo de cana e açai), sendo essa última relacionada a surtos, principalmente na região Norte do Brasil (SOUZA, *et al.*, 2016; DIAS *et al.*, 2016).

A Doença de Chagas se manifesta em diferentes formas clínicas: aguda, crônica cardíaca e gastrointestinal, e crônica indeterminada. Na fase aguda, caracterizada pela presença de formas circulantes na corrente sanguínea, há intensa resposta inflamatória e ativação da resposta imune inata, com consequente produção de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , características de uma resposta Th1. A fase crônica, é caracterizada por inflamação local e lesão tecidual resultante da ação citotóxica de células T CD8+, e pode gerar cardiopatias e megasíndromes (esôfago e intestino) ou pode ser indeterminada, na qual não causa a patogênese previamente descrita tendo regulação da resposta imune pela produção de citocinas regulatórias IL-10 e IL-17 (revisado por PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Apesar do surgimento de novas drogas candidatas ao controle da doença (revisado por URBINA, 2015), o tratamento de pacientes chagásicos ainda é limitado a apenas dois medicamentos: benznidazol e nifurtimox (OPAS, 2009; SOBRINHO *et al.*, 2009), que possuem alguns efeitos negativos como problemas de tolerância e eficácia (ALDASORO *et al.*,

2018; MOLINA *et al.*, 2014). Ainda, estudos com drogas candidatas não consideram a multiplicidade de características genéticas (genótipos e fenótipos) existentes de *T. cruzi* (ZINGALES, *et al.*, 2014).

*T. cruzi* é um protozoário diploide que se reproduz de forma assexuada (fissão binária) e possui predomínio de propagação genética clonal gerando genótipos relativamente idênticos (ZINGALES, *et al.*, 2012). No entanto, hipóteses baseadas em aspectos evolutivos do parasita e de possibilidade de troca de material genético indicam a formação de cepas de *T. cruzi* híbridas. Essa troca de material genético ocorre, possivelmente, por fusão nuclear, formando organismos poliploides que realizam trocas de material por recombinação alélica e posteriormente perdem esses cromossomos e são estabilizados por propagação clonal (revisado por ZINGALES, 2011).

Devido a seu genoma diversificado e variedade de genótipos e fenótipos, *T. cruzi* é dividido em seis diferentes grupos (Tc I a VI) classificados por similaridade genética e baseados na biologia evolutiva desse protozoário, denominados DTUs (do inglês, “*Discrete typing unit*”). Essas DTUs visam abranger diferentes características do parasita: genéticas, moleculares, epidemiológicas e patogênicas (HIGUERA; GUHL; RAMÍREZ, 2013; ZINGALES *et al.*, 2012). De acordo com o modelo de hibridização-dupla proposto para explicar troca de material genético durante o processo de evolução de *T. cruzi*, as DTUs Tc I e II tem origem de apenas um ancestral comum e se propagaram de forma clonal, enquanto Tc III, IV, V e VI são modelos híbridos provenientes de uma hibridização inicial entre Tc I e II e subsequentes processos de hibridização e mutações (ZINGALES *et al.*, 2012).

Ainda, *T. cruzi* apresenta elevada plasticidade genética permitindo que esse organismo seja capaz de se adaptar de forma rápida a diferentes ambientes aos quais é submetido durante seu ciclo de vida, mediante a indução de fenótipos favoráveis à sua sobrevivência. Essa plasticidade resulta em diversidade genética entre cepas/clones específicos e pode levar à modificação de cromossomos inteiros, alterando o número de cópias destes, a modificações em regiões cromossômicas específicas através de expansão no número de cópias de um determinado gene e, conseqüentemente, alterando seu perfil de expressão (REIS-CUNHA *et al.*, 2015; REIS-CUNHA; VALDIVIA; BARTHOLOMEU, 2018).

Cepas pertencentes a duas diferentes DTUs foram avaliadas no presente estudo: cepa CL (*T. cruzi* Tipo VI), e cepa G (*T. cruzi* Tipo I). Tc I representa a DTU com maior distribuição geográfica e está presente nas Américas do Norte, Sul e Central. Essa engloba tanto o ciclo

silvestre quanto doméstico de distribuição do parasita e cepas pertencentes à Tc I estão relacionadas ao quadro de cardiomiopatia da doença. A cepa G, utilizada como representante de Tc I é exclusivamente de distribuição silvestre, principalmente em marsupiais. Tc VI é prevalente na região cone Sul americana e na região do Grande Chaco e é raramente encontrada no ciclo silvestre do parasita. Essa DTU está relacionada a cardiomiopatias e a megasindromes em humanos (ZINGALES, 2018; ZINGALES *et al.*, 2009).

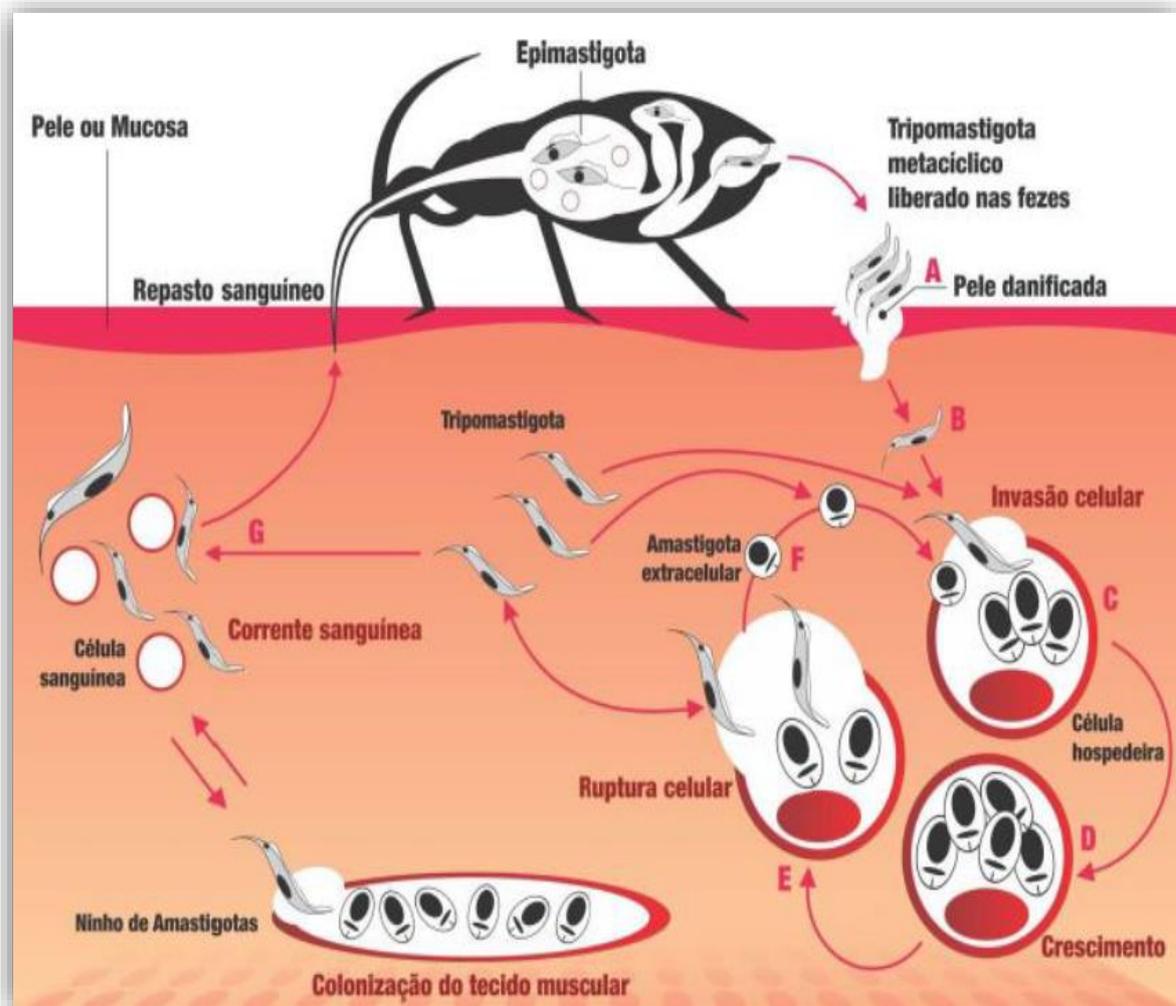
O ciclo de vida de *T. cruzi* mantêm-se pela alternância entre dois hospedeiros: vertebrado (mamíferos) e invertebrados (BRENER, 1997), insetos hemípteros da Família Reduviidae, tendo como gêneros mais estudados e considerados importantes: *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (JORGE; CASTRO, 2000; OPAS, 2009).

*T. cruzi* possui diferentes formas morfo-evolutivas, caracterizadas pela presença e posição do cinetoplasto, uma estrutura mitocondrial formada por uma rede de fibrilas de DNA que se estende pelo corpo do parasito, e pela localização do seu flagelo. Nas formas epimastigotas (EPI), essas estruturas estão em posição anterior ao núcleo enquanto nas formas tripomastigotas metacíclicos (TM) e tripomastigotas sanguíneos (TS) o flagelo emerge da bolsa flagelar, localizada próximo ao cinetoplasto. No entanto, formas esféricas denominadas amastigotas não apresentam flagelo aparente, sendo este interiorizado na bolsa flagelar; o cinetoplasto nessas formas encontra-se entre o núcleo e a bolsa flagelar (BRENER, 1997; DE SOUZA, 2002; TOMLINSON *et al.*, 1995).

As formas epimastigotas (EPI) – intestino médio (replicativa) e tripomastigotas metacíclicos (TM) – intestino distal (infectiva) podem ser encontradas no hospedeiro invertebrado (inseto). No hospedeiro vertebrado (mamífero), *T. cruzi* apresenta-se como um parasita intracelular obrigatório e está presente nas formas amastigotas intracelular (AI) (replicativa) e tripomastigotas sanguíneos (TS) (infectiva) (BERN, 2015; CLAYTON, 2010).

O hospedeiro invertebrado caracteriza-se por ser um inseto hematófago e durante o processo de repasto sanguíneo o mesmo causa lesão tecidual e elimina fezes e urina contendo TM, quando infectado por essas formas; TM infectam o hospedeiro vertebrado através da lesão causada pelo inseto e invadem células por diferentes processos; uma vez na célula, TM se diferenciam em amastigotas e após o fim da sua replicação, amastigotas se diferenciam em TS que estão prontos para infectar novas células e manter a infecção, assim como infectar novos

vetores invertebrados dando continuidade ao ciclo (Figura 1) (BERN, 2015; MOLINA *et al.*, 2014; SOUZA; MORAES *et al.*, 2016).

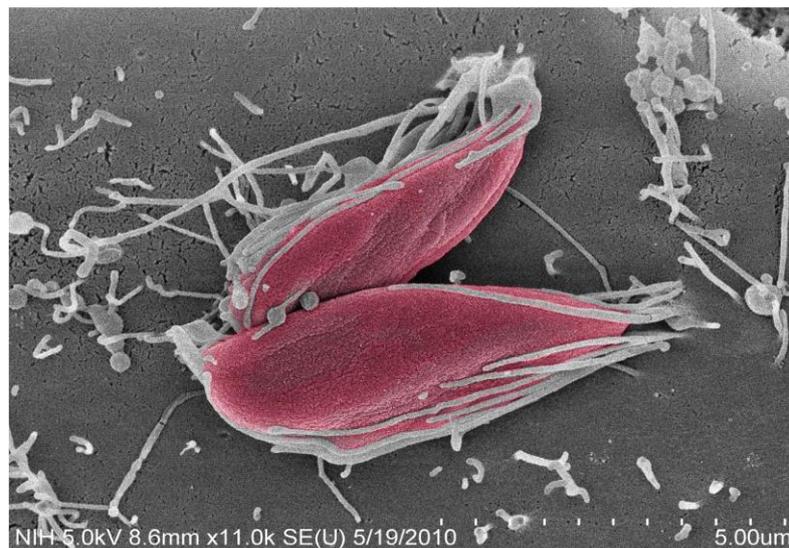


**Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.** Durante o repasto sanguíneo o triatomíneo (inseto) libera formas Tripomastigotas Metacíclicas (TM) nas fezes, essas formas invadem células do hospedeiro vertebrado através da pele danificada (A e B). No citoplasma da célula, TM se diferenciam em Amastigotas Intracelulares (AI) e se multiplicam (C e D). Quando ocorre a ruptura celular são liberadas tanto formas amastigotas, AEs, em caso de ruptura precoce, quanto formas Tripomastigotas Sanguíneas (TS), quando há a diferenciação intracelular (E e F). No sangue, as formas TS podem também se diferenciar em AEs que invadem novas células (F). Essas formas TS ainda podem colonizar o tecido muscular do hospedeiro ou permanecer na corrente sanguínea e infectar um novo triatomíneo durante seu repasto sanguíneo (G). TS, quando ingeridas pelo inseto, se diferenciam em formas Epimastigotas (EPI) e após alguns dias de infecção se tornam TM (intestino distal) que podem infectar um novo hospedeiro vertebrado, mantendo seu ciclo de vida. Fonte: LIMA *et al.*, 2010.

## 1.2. Amastigotas Extracelulares, uma forma alternativa de manutenção da infecção de *T. cruzi*

Um subciclo alternativo da doença foi descrito no hospedeiro vertebrado (Figura 1). Formas liberadas pela eclosão precoce de células ou por diferenciação de formas TS circulantes, denominadas Amastigotas Extracelulares (AEs) (Figura 2), possuem capacidade infectiva e de manutenção da infecção (revisado por FERREIRA *et al.*, 2012).

Ley e colaboradores constataram em experimentos *in vitro* que 90% dos AEs diferenciados em meio ácido (LIT, pH 5,8) quando colocados em contato com monócitos eram internalizados enquanto apenas 30% de amastigotas intracelulares (AI) purificados de células o realizavam. Apesar dessa diferença de capacidade infectiva, esses parasitos apresentam taxa de multiplicação parecida. Esse mesmo estudo mostrou que a inoculação de camundongos com formas AEs pode levar a um quadro de letalidade (LEY, *et al* 1988). Detectou-se em camundongos, quando em fase aguda, que cerca de 10% da população de parasitas circulante eram AEs (ANDREWS *et al*, 1987).



**Figura 2.** Polimerização de actina induzida por formas AEs de *Trypanosoma cruzi* da cepa G na superfície de célula Hela analisada por microscopia eletrônica de varredura. Fonte: FERREIRA *et al.*, 2012.

Cepas que tem como principal característica alta infectividade das formas TM, como, por exemplo, CL (Tc VI) e Y (Tc II), apresentam suas formas AEs com baixa infectividade. Já cepas pouco infectivas para formas TM mostram um padrão oposto, possuem alta capacidade de invasão por formas AEs, como a cepa G (Tc I). Essas diferenças já foram demonstradas

experimentalmente *in vitro* em células HeLa e Vero (FERNANDES et al., 2013; MORTARA et al., 1999; PROCOPIO et al., 1998).

Experimentos *in vitro*, através de localização por marcador de LAMP-1 (do inglês, “Lysosome-associated membrane protein”), demonstraram que formas AEs conseguem ser detectadas nas células invadidas no período de 1 hora após contato e parecem escapar mais rapidamente do vacúolo parasitóforo que formas TM (MORTARA et al., 1999).

Os mecanismos envolvidos no processo de invasão dessas formas ainda não são completamente elucidados. AEs utilizam de estratégias como polimerização de actina em fagócitos não profissionais, por meio de uma estrutura em forma de taça (Hela) ou por formação de crateras no citoplasma (Vero), e aderem preferencialmente ao dorso da célula, em contraste com formas TM que invadem pela periferia celular (FERNANDES et al., 2013; MORTARA et al., 2005; MORTARA; BOTUCATU, 1991; PROCOPIO et al., 1998).

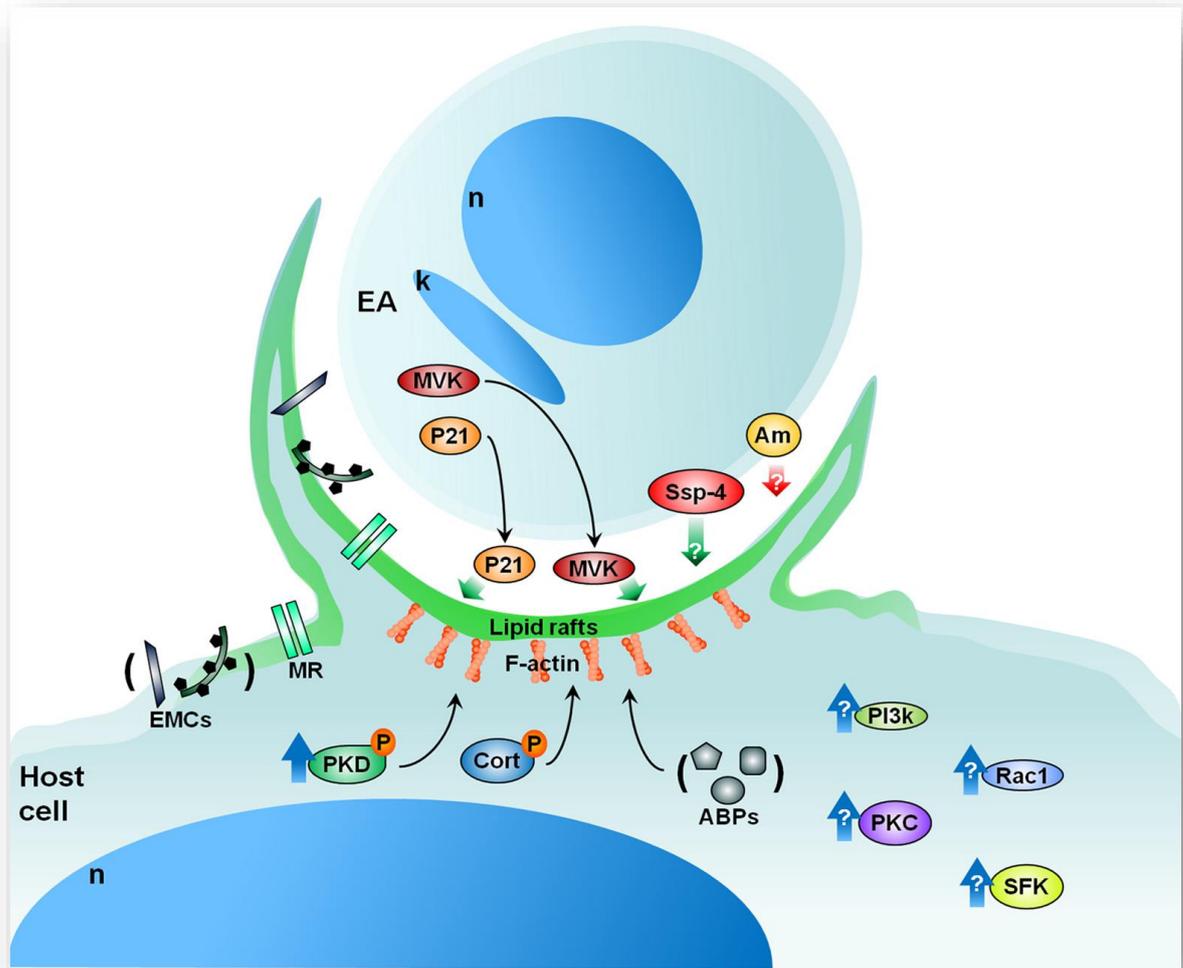
A proteína p21 (*T. cruzi* P21), expressa em todos os estágios morfológicos de *T. cruzi*, parece ter efeito durante processo de invasão dessas formas (DA SILVA, et al., 2009). Rodrigues e colaboradores mostraram que o tratamento com *T. cruzi* P21 recombinante induz o recrutamento de actina em macrófagos durante a infecção por amastigotas extracelulares de *T. cruzi*. Ainda, o tratamento com essa proteína leva ao aumento do número de parasitas internalizados de diferentes patógenos flagelados como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis* e *Toxoplasma gondii* nas formas amastigota extracelular, promastigota e traquezoíta, respectivamente (RODRIGUES et al., 2012).

Entretanto, uma glicoproteína de superfície altamente expressa por formas AI, denominada  $\delta$ -amastina (Am), quando superexpressa em formas AEs mais infectivas (cepa G) tem sua capacidade infectiva reduzida. Essa proteína é naturalmente regulada positivamente em formas AEs da cepa CL (menos infectiva) quando comparadas a cepa G (mais infectiva), indicando a possibilidade de influenciar na redução da taxa de parasitas internalizados (CRUZ et al., 2012).

Recentemente, a enzima mevalonato quinase (MVK), presente em diferentes organismos, desde mais simples como bactérias a mais complexos como mamíferos, e que está relacionada ao processo metabólico da síntese de isoprenoides, foi descrita como uma proteína *moonlighting*. Proteínas *moonlighting* são assim definidas por apresentarem uma função secundária distinta – e inesperada – da que desempenha primariamente (BAHIA, 2017).

Ferreira e colaboradores demonstraram que MVK em *T. cruzi*, além de participar da via de síntese de isoprenoide, localizando-se em glicossomos é também secretada pelo parasita. Além disso, ao adicionar MVK recombinante às células HeLa há ativação de proteínas quinases responsáveis pelo remodelamento do esqueleto de actina (SRC/FAK). MVK, ainda, apresenta um papel secundário em *T. cruzi* relacionado à modulação positiva de invasão de formas AEs *in vitro*, caracterizando-se como uma enzima *moonlighting* (FERREIRA, *et al.*, 2016).

Em revisão realizada por Ferreira e colaboradores (Figura 3), estes propõem um modelo de sinalização durante o processo de invasão de formas AEs, que incluem moléculas já citadas previamente e, ainda, outras proteínas como Ssp-4, glicoproteínas de superfície exclusivamente produzidas por essa forma, envolvidas na adesão e entrada na célula do hospedeiro. Quanto ao ponto de vista do hospedeiro, balsas lipídicas parecem ser fundamentais na internalização de AEs, uma vez que a depleção de colesterol, maior componente dessas estruturas, tem efeito negativo na invasão por essas formas. EAs também recrutam proteína quinase D (PKD), actina (F-actina), proteínas ligantes de actina (ABPs – cortactina, gelsolina e  $\alpha$ -actina) quando em contato com o hospedeiro. Receptores de superfície celular, como o receptor de manose de alguns tipos celulares, podem reconhecer resíduos de manose secretados por AEs e participar na invasão (BONFIM-MELO *et al.*, 2015; FERREIRA, *et al.*, 2012).



**Figura 3. Modelo de sinalização de formas AEs durante o processo de invasão proposto por Ferreira e colaboradores (2012).** n. núcleo; k. cinetoplasto; **Host cell.** Célula hospedeira; **EA.** Amastigota Extracelular; **EMCs.** Componentes da matriz extracelular; **MR.** receptor de manose; **Ssp-4.** Am. amastina; **MVK.** mevalonato quinase; **P21.** proteína P21; **PKD.** Proteína quinase; **cort.** cortactina; **ABPs.** proteínas ligantes à actina; **PI3K.** fosfatidilinositol-3-quinase; **PKC.** proteína quinase C; **Rac1.** proteína relacionada a Ras; **SFK.** família Src quinase; **Lipid rafts.** Balsas lipídicas. Fonte: Ferreira *et al.*, 2012.

### 1.3. Proteínas quinases (PK)

Proteínas quinases (PK, do inglês “Protein Kinase”) são enzimas que apresentam um domínio quinase, de 250 a 300 resíduos aminoacídicos, conservado em diversos organismos. Essas proteínas catalisam a reação de adição de grupamentos fosfatos ( $PO_4^{3-}$ ) de moléculas doadoras de alta energia, como adenosina trifosfato (ATP), a elas mesmas, processo denominado autofosforilação, ou a outras proteínas-alvo específicas de forma unidirecional. O processo de fosforilação altera sítios de ligação específicos dessas proteínas ou das quais sofreram fosforilação, modificando sua estrutura alostérica e conseqüentemente seu estado funcional. Esse processo pode ser revertido por proteínas denominadas fosfatases que retiram esses grupamentos (desfosforilação) (HANKS; QUINN; HUNTER, 1988; HUNTER, 1995; WANG; COLE, 2015).

As PK representam a maior família de proteínas em organismos eucariotos (COHEN, 2002) e são fundamentais para processos celulares como metabolismo, sinalização celular (regulação e transdução de sinais), remodelação do citoesqueleto celular, movimento celular, apoptose, homeostase, diferenciação, respostas fisiológicas e imunológicas (GREEN; LLAMBI, 2015; GROOTJANS et al., 2016; SAXTON; SABATINI, 2017). Uma quinase é assim definida pela presença do domínio catalítico quinase (DCK) (MILLER; TURK, 2018). Domínios são estruturas compactas e estáveis da cadeia polipeptídica, de enovelamento independente da conformação natural da proteína, que possuem uma função biológica particular (JOHNSON; NOBLE; OWEN, 1996). DCK é onde ocorre a catálise do resgate de fosfatos de moléculas doadoras de energia, as quais posteriormente serão transferidas a aminoácidos específicos, caracterizando o processo de fosforilação (HANKS; HUNTER, 1995).

PK são divididas em duas famílias superfamílias de proteínas que contém o domínio catalítico quinase: proteínas quinases eucarióticas (ePK) e proteínas quinases atípicas (aPK). Atualmente, em humanos podem ser identificadas 478 ePK e 40 aPK genes, totalizando 518 proteínas quinases descritas. Essas proteínas são classificadas por similaridade da sequência do domínio quinase e estrutura, além da existência de outros domínios e regulação desses (MANNING, 2002; MARTIN; ANAMIKA; SRINIVASAN, 2010). Ainda, já foram descritas 540 quinases hipotéticas para camundongos, sendo que 510 dessas são ortólogas às quinases presentes em humanos quando comparados os quinomas das duas espécies. Trinta quinases foram classificadas como exclusivas de camundongos e 8 quinases apareceram apenas no quinoma humano (CAENEPEEL *et al.*, 2004).

ePK são classificadas em tres grandes categorias de acordo com o resíduo aminoacídico que fosforila: 1) tirosina quinases, 2) serina/treonina quinases e 3) TK-like quinases. As serina/treonina quinases compreendem os grupos: quinases STE/MAP (do inglês, MAPK), proteínas quinases dependente de cálcio/calmodulina (CaMK), quinases dependente de ciclina (CMGC), proteínas quinases dependentes de cAMP (AGC), e quinase celular-1 (CK1). Já a classe de proteínas tirosina quinases são divididas entre proteínas ancoradas e não ancoradas a membrana citoplasmática, abrangendo os grupos receptores guanilato ciclase (RGC) e tirosina quinases (TK). A classe de proteínas quinases TK-like (do inglês, Tyrosine kinase-like) contém proteínas que fosforilam resíduos tanto de tirosina quanto de serina e treonina (HANKS; QUINN; HUNTER, 1988; MANNING, 2002).

As proteínas quinases aPK possuem atividade catalítica do domínio quinase comprovada, porém são classificadas em um grupo distinto devido à ausência de similaridade com os domínios das ePK. Essas proteínas representam menos de 10% das quinases existentes e suas famílias são compostas, geralmente, de um a seis membros. Os grupos descritos para essa classe de proteínas atípicas compreendem: alfa quinases, fosfatidilinositol quinases (PIKK), A6-quinases, ABC1 quinase, piruvato desidrogenase-quinase (PDHK), RIO-quinase, bromodomínio-quinase (BRD2), BCR-quinase (do inglês, breakpoint cluster region kinase), dentre outras quinases (HANKS; QUINN; HUNTER, 1988; MANNING, 2002).

A interação entre PK durante a cascata de sinalização celular é uma importante forma de direcionamento de respostas em diversas condições e essas têm sido vastamente estudadas. A flexibilidade do curso de sinalização celular é fundamental para a manutenção da homeostase e, dessa forma, a desregulação de quinases, induzida muitas vezes por mutação gênica, que conduz a uma expressão desordenada, ou modificação de inibidores endógenos, prejudica esse estado e pode levar a diferentes desordens (LAHIRY et al., 2010). PK e interações entre vias de sinalização têm sido amplamente utilizadas como alvo terapêutico devido à especificidade dos diversos inibidores existentes para muitas quinases (COHEN, 2002; SILVA, et al., 2009) e estão associadas a diversas patologias como câncer, doenças neurodegenerativas (ex. Alzheimer), doenças autoimunes, diabetes (FERGUSON; GRAY, 2018), e no direcionamento de respostas imunes induzidas microrganismos (protozoários, fungos, bactérias, vírus) (BLANDER; SANDER, 2012).

#### 1.4. Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPK)

MAPK (do inglês, *Mitogen-activated protein kinase*) é uma família de proteínas serina/treonina quinases (MANNING, 2002), altamente conservadas desde organismos unicelulares a organismos mais complexos como humanos (MODY; WEINER; RAMANATHAN, 2009), capazes de induzir a ativação de diversas respostas celulares através da conversão de estímulos externos. Proteínas quinases pertencentes a essa via estão envolvidas em diversos processos de sinalização celular, como expressão gênica, resposta a estresse, apoptose, resposta imune e proliferação (CARGNELLO; ROUX, 2011; RAMAN; CHEN; COBB, 2007).

Existem duas classes de MAPK descritas em mamíferos: MAPK convencionais (cMAPK) e MAPK atípicas (aMAPK). As cMAPK são a classe de proteínas mais amplamente estudadas e compreendidas, essa abrange: 1) Quinases reguladas por estímulos extracelulares (ERK1/2); 2) Quinases c-Jun amino N -terminal 1/2/3 (JNK1/2/3); 3) p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$ ) e 4) ERK5. Já as aMAPK indentificadas englobam 1) ERK3/4, 2) ERK7, e 3) Nemo-like quinases (NLK) (CARGNELLO; ROUX, 2011; TURJANSKI; VAQUÉ; GUTKIND, 2007).

Proteínas MAPK sofrem fosforilação em dois resíduos conservados de treonina (Thr) e tirosina (Tyr) presentes no seu sítio de ativação para que sejam ativadas por completo, sendo esses separados geralmente por apenas um aminoácido entre os aceptores de grupamentos fosfato, caracterizando um motivo tripeptídico (TXY). Por exemplo, ERK (ERK1, ERK2 e ERK5) Thr-(Glu)-Tyr; JNKs (JNK1-3) Thr-(Pro)-Tyr; e as isoformas de p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$ ) Thr-(Gly)-Tyr (TURJANSKI; VAQUEÁND; GUTKIND, 2007; PEARSON *et al.*, 2001;).

Essa via é ativada devido a estímulos externos como mitógenos, citocinas inflamatórias, danos ao DNA, fatores de crescimento e estresse. ERK1/2 é ativada por fatores de crescimento, homônios e estímulos pró-inflamatórios, enquanto JNK1/2/3 e p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$ ) são ativadas por estresse e estímulos pró-inflamatórios (MIN *et al.*, 2018; HU *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2015; MOYES *et al.*, 2010; BALARAMAN *et al.*, 2005; KYRIAKIS, 1999).

A transdução de sinais externos mediado por MAPK culmina no desencadeamento de uma série de estímulos consecutivos, assim como demonstrado resumidamente na Figura 4, uma MAPK3 ativa a MAPK2 (MEK1/2; MKK3/6; MKK4/7) que leva a ativação de uma posterior MAPK (ERK1/2; p38; JNK1/2) (KOLCH, 2005; KUMAR; BOEHM; LEE, 2003).

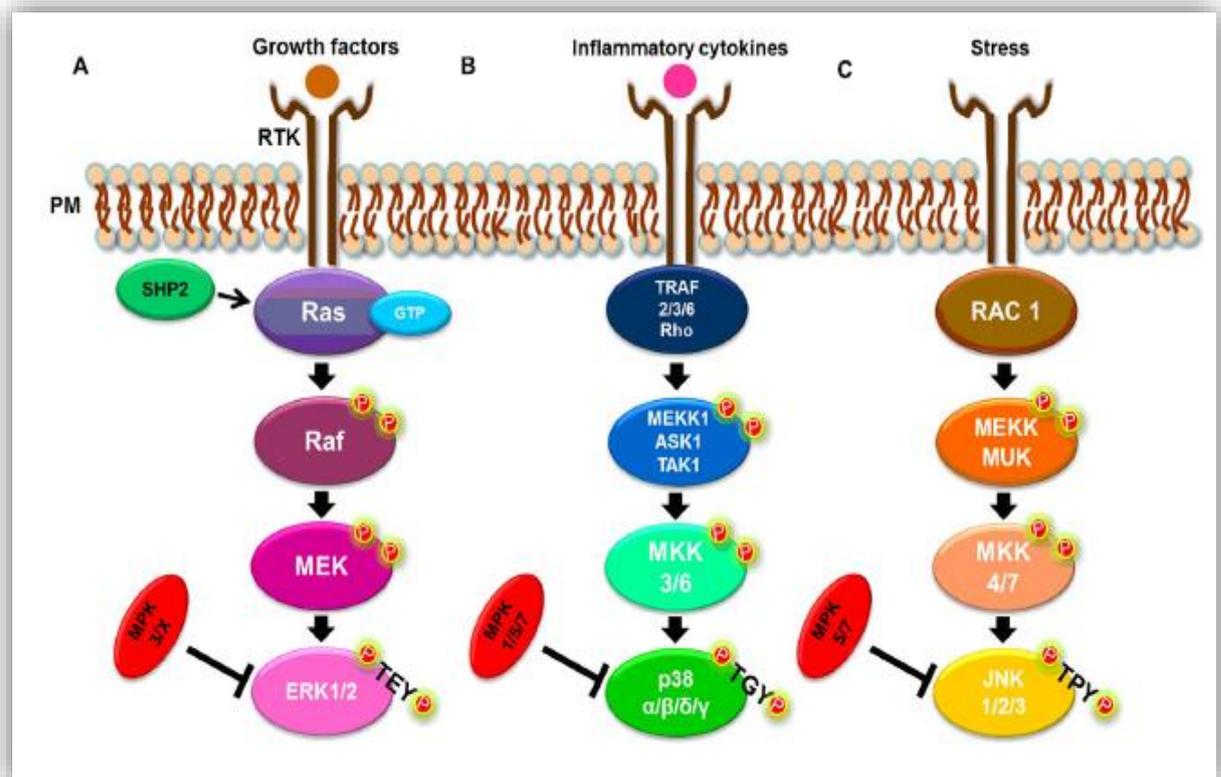
A especificidade da propagação de sinal é dada por interação proteína-proteína e de proteínas adaptadoras, componentes fundamentais na eficiência de propagação do sinal de fosforilação durante o processo de sinalização celular (BARDWELL, 2006; CHANG, L.; KARIN, 2001).

Diversos receptores de superfície celular, como receptores tirosina quinases (RTK), receptores de interleucinas, receptores *toll-like* (TLRs), receptores acoplados a proteínas G (GPCR) e proteínas de adesão como integrinas, quando estimulados desencadeiam diferentes rotas de sinalização citoplasmática que resultam em interações com proteínas GTPases, outras quinases, fosfolipases e proteínas adaptadoras (GRIMSEY *et al.*, 2018; DAS *et al.*, 2018; LEMMON; SCHLESSINGER, 2010; IHLE, 1995). O receptor tirosina quinase EGFR, por exemplo, é uma das proteínas de superfície envolvidas na ativação da cascata que culmina na ativação de ERK1/2 (revisado em BYEON; KU; YANG, 2019). Essa interação de proteínas leva à ativação e translocação de quinases para o núcleo e consequente controle da expressão gênica, através da modificação do estado de fosforilação de fatores de transcrição (ativação e formação de dímeros), regulação da estabilidade de mRNA (fosforilação de proteínas ligadas a ele), remodelamento da cromatina (proteínas *downstream* MSK e RSK), e agem também como co-ativadoras e inibidoras (retenção citoplasmática de fatores de transcrição) (TURJANSKI; VAQUEÍ; GUTKIND, 2007; KOLCH, 2005).

Existe uma gama de proteínas nucleares reguladas por MAPK que funcionam como fatores de transcrição e estão envolvidos em diferentes processos celulares. A ativação da MAPK ERK/2 está relacionada a proliferação celular, diferenciação e sobrevivência e participa da regulação dos fatores de transcrição como ELK1, cMyc, cFos, Smads (1-4). Já a via MAPK p38 está envolvida no processo inflamatório e de diferenciação celular e pode levar a ativação de alguns fatores como ATF2, ELK1, cFos, MEF2 e p53. A MAPK JNK induz respostas direcionadas a apoptose, e também, proliferação e diferenciação. cJun, ATF2, ELK1 e cMyc são exemplos de fatores de transcrição que podem ser ativados por essa via (TURJANSKI; VAQUEÁND; GUTKIND, 2007; CHANG *et al.*, 2003; PEARSON *et al.*, 2001).

A cascata canônica de ativação mediada por MAPK pode ser regulada por diferentes proteínas pertencentes a classe de tirosina fosfatases denominadas MAP quinase (MKP). Essas fosfatases são codificadas pela família gênica DUSP, que são divididas em diferentes subclasses de acordo do resíduo de desfosforilação de preferência. Proteínas MKP atuam induzindo a retirada de grupamentos fosfatos de MAPK específicas, levando a sua consequente desativação

e, muitas vezes, ao impedimento da transmissão de resposta. Essas proteínas apresentam especificidade no processo de desfosforilação de substratos; por exemplo, MKP 1, 5 e 7 atua sobre as MAPK p38 e JNK enquanto MKP 3, X e 4 têm maior afinidade pela MAPK ERK1/2, faz com que essas fosfatases sejam alvo de diferentes estudos, principalmente relacionados na regulação de respostas imunes inata e celular (LIU, *et al.*, 2016; JEFFREY *et al.*, 2007; LIU; SHEPHERD; NELIN, 2007; OWENS; KEYSE, 2007).



**Figura 4. Via de sinalização de MAPK simplificada.** A) Via de quinases reguladas por estímulos extracelulares (ERK1/2); B) Quinases c-Jun amino N-terminal 1/2/3 (JNK1/2/3); C) p38 (α, β, δ e γ). **Fosfatases:** SHP2, MPK 3/X, MPK 1/5/7, MPK5/7. **P.** Fosforilação. **Sítios de fosforilação:** TEY, TGY, TPY. **RTK.** Receptor tirosina quinase. **PM.** Membrana plasmática. Fonte: SOARES-SILVA, *et al.*, 2016.

### 1.5. Resposta Imune e via MAPK

Durante o processo infeccioso mediado por patógenos, o acionamento de uma resposta imune efetiva é fundamental no impedimento da proliferação e do estabelecimento da infecção (EBERL, 2016).

O sistema imune inato é essencial não só na detecção de patógenos, mas também na manutenção da homeostase, desde o reparo de tecidos danificados a eliminação de células senescentes ou apoptóticas. Porém, essa apresenta uma memória curta e depende da sincronia e do orquestramento de uma resposta mais especializada, a adaptativa (EBERL, 2016; YATIM; LAKKIS, 2015).

A imunidade inata permite uma resposta imediata muito eficiente na eliminação de patógenos e além de possuir capacidade de diferenciação dos elementos próprios dos não próprios. Essa abrange células fagocíticas, sistema do complemento e receptores de superfície (PRRs), sendo os receptores tipo toll-like (TLRs) a classe mais ampla, capazes de reconhecer padrões moleculares específicos de diferentes patógenos (PAMPs). Ainda, esse sistema é capaz de reconhecer e diferenciar entre patógenos e microrganismos comensais (BLANDER; SANDER, 2012).

O reconhecimento de componentes secretados por patógenos leva a expressão de genes inflamatórios e a iniciação da resposta imune inata. Células inatas especializadas (APCs) são capazes de reconhecer antígenos de inúmeros patógenos através de diferentes PRRs, processar e apresentar a células T *naive* através de moléculas MHC (do inglês *Major Histocompatibility Complex*) e do receptor de células T (TCR), que reconhecem essas células e induzem a produção de sinais co-estimulatórios garantindo a proliferação e diferenciação de células T, processo essencial para o direcionamento do curso da resposta imune adaptativa (YATIM; LAKKIS, 2015).

Linfócitos T e células B, células altamente especializadas, desempenham importante papel durante a resposta imune adaptativa. Células B, produtoras de imunoglobulinas (Igs), são fundamentais no processo neutralização de toxinas, vírus e de opsonização de patógenos durante a infecção. Já as células T, são responsáveis por orquestrar a resposta imune mediada por um invasor através da promoção da proliferação, maturação e ativação da função imunológica de outras células (B e T), células T helper, ou funcionam diretamente como efetoras na morte celular, células T citotóxicas (EBERL, 2016; YATIM; LAKKIS, 2015).

*T. cruzi* é capaz de induzir a ativação de inúmeros genes inflamatórios através do estímulo de diferentes TLRs. Alguns padrões (PAMPs) identificados são proteínas mucinas ligadas a âncoras glicosilfosfatidil-inositol (tGPI) e glico-inositolfosfolipídeos (eGPI), reconhecidas pelos TLRs 2 e 4, respectivamente. TLRs endossomais, como TLR9 estimulado por DNA genômico rico em regiões CpG e TLR6 que reconhece moléculas de RNA, também são relacionados ao reconhecimento de componentes desse parasito (revisado por RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012).

Os estímulos resultantes do reconhecimento de patógenos e do consequente desenvolvimento da resposta é mediado por diversas vias celulares do hospedeiro. A cascata de MAPK é uma das formas de comunicação entre um estímulo externo mediado por patógenos e a formação da resposta imune (SIMON; ARTHUR; LEY, 2013). MAPK expressa de forma ubíqua e está relacionada com a coordenação celular da produção de diferentes citocinas e interleucinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias (HUANG; SHI; CHI, 2009). ERK1/2 direciona a produção de interleucinas como TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$  e IL-10 e regula negativamente a produção de IL-12, IFN- $\beta$  e iNOS. Já a via de p38 regula a redução da síntese de TNF- $\alpha$  e produção de IL-12. IL-1, IL-6 e CXCL8 (IL-8), citocinas pro-inflamatórias, têm sua expressão induzida por ambas vias e também por NF $\kappa$ B (SIMONS; ARTHUR; LEY, 2013; GAESTEL; BLANDER; SANDER, 2012; KOTLYAROV; KRACHT, 2009).

Citocinas e interleucinas são produzidas por uma gama de células, essas estão envolvidas em diversos processos durante a resposta imune e desempenham funções cruciais para a propagação de uma resposta imune eficiente. Algumas das funções dessas proteínas são descritas a seguir: 1) IL-1- $\beta$  está relacionada a proliferação de células B e síntese de imunoglobulinas; 2) TGF- $\beta$  atua como fator inibitório para células B e TCD8+, fagócitos mononucleares e células NK além de apresentar papel importante na amenização de respostas alérgicas. 3) IL-12, produzida por diversas células desde monócitos, células B, células dendríticas, macrófagos especializados a células epiteliais, age como indutora de processos como proliferação, citotoxicidade e produção de citocinas por células NK, outro importante papel dessa proteína é na regulação da proliferação de células T helper e T CD8+. 4) CXCL8 (IL-8) é produzida por diferentes células epiteliais e por células do sistema imune (macrófagos, neutrófilos, células T). Essa quimiocina é importante no recrutamento de neutrófilos polimorfonucleares e na aderência dessas células. 5) IL-6 é sintetizada por monócitos, células endoteliais e epiteliais, queratinócitos, hepatócitos e células da medula óssea. Essa interleucina

promove ativação, diferenciação e maturação de células T, proliferação de mastócitos, e induz a produção de IL-1ra (antagonista do receptor de IL-1) regulando negativamente a produção de IL-1 e TNF- $\alpha$  (BORISH; STEINKE, 2003; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Há evidências de que *T. cruzi* utilize de estratégias no direcionamento da resposta imune do hospedeiro para manutenção da infecção (BASSO, 2013). No entanto, a forma como *T. cruzi* modula a resposta imune do hospedeiro para manter a infecção agindo sobre as vias de sinalização das MAPKs não é vastamente estudada e totalmente compreendida. No entanto, *Leishmania spp.*, também um protozoário da família Trypanosomatidae, evade a resposta imune do hospedeiro, atuando sobre a via CD40/MAPK. *Leishmania* impede a realocação de CD40, fator co-estimulatório de células T subtipo Th1, para a membrana plasmática para modular a sinalização CD40/MAPK de p38 para ERK1/2, subvertendo a produção de citocinas regulatórias de IL-12 para IL-10, impedindo a formação da resposta do tipo Th1 e favorecendo a infecção por meio do estabelecimento de uma resposta do tipo Th2. *Leishmania* também induz aumento na produção de IL-10, atuando sobre fosfatases (MKP-1 e MKP-3) (revisado por SOARES-SILVA *et al.*, 2016).

Visto que outros tripanossomatídeos da mesma família que *T. cruzi* modulam a resposta celular de forma a favorecer sua manutenção no hospedeiro atuando sobre a via MAPK, o presente estudo buscou avaliar e compreender o perfil de ativação dessa via, induzido por formas amastigotas extracelulares (AEs) de *T. cruzi* das cepas G e CL, cepas que apresentam diferentes infectividades, e seus efeitos na modulação da resposta imune através de experimentos *in vitro* em células epiteliais (Hela). Para cumprir esse objetivo, foi realizada análise da cinética de ativação das MAPKs p38 e ERK1/2, de outras quinases e da fosfatase MKP1 induzida por formas AEs de *T. cruzi* durante a infecção, em diferentes intervalos de tempo, por *Western blotting*. O perfil de expressão de interleucinas e de fatores de transcrição ativados por MAPK foi avaliado por meio de RT-PCR. Experimentos de invasão utilizando inibidores específicos para diferentes quinases pertencentes à via MAPK (p38, ERK1/2 e JNK), da MAP2K MEK e do receptor de fator epidermal (EGFR) também foram realizados com o objetivo de verificar a participação dessas vias durante o processo de invasão. Um esquema de vias de ativação pelas cepas G e CL de *T. cruzi* foi proposto ao final.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Elucidar o perfil de ativação da via de MAPK mediado por formas amastigotas extracelulares (AEs) de *T. cruzi* das cepas G e CL e seus possíveis efeitos na modulação da resposta imune do hospedeiro *in vitro*.

### 2.2. Objetivos específicos

- i. Verificar a taxa de invasão de AEs da cepa G e CL em células HeLa tratadas com inibidores específicos para diferentes quinases pertencentes à via MAPK e vias relacionadas;
- ii. Analisar a cinética de ativação das MAPKs p38 e ERK1/2 induzida por formas AEs de *T. cruzi* durante a infecção, em diferentes intervalos de tempo, das cepas G e CL em células HeLa;
- iii. Avaliar o perfil de expressão das interleucinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias induzido por AEs das cepas G e CL em células HeLa, em diferentes intervalos de tempo de infecção;
- iv. Avaliar a expressão de fatores de transcrição ativados por MAPK e da via NF $\kappa$ B mediante a interação com AEs das cepas G e CL em células HeLa, em diferentes intervalos de tempo de infecção.

### 3. Metodologia

#### 3.1. Culturas celulares

##### 3.1.1. Cultivo de células HeLa

Células epiteliais provenientes de adenocarcinoma cervical (células HeLa) imortalizadas foi a linhagem utilizada em todos os ensaios do projeto, como descrito anteriormente (PROCOPIO *et al.*, 1998). Estas foram cultivadas em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Gibco® pH=7,2 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina 10.000 U.I/ml-estreptomicina 10mg/ml) e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

##### 3.1.2. Cultivo de células Vero

A manutenção do ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi in vitro* foi realizada em células epiteliais de rim do macaco verde africano (células Vero) imortalizadas. As células Vero foram cultivadas em meio RPMI 1640 Gibco® pH=7,2 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina 10.000 U.I/ml e estreptomicina 10 mg/ml) e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2. Obtenção de parasitas

Parasitas das cepas G (YOSHIDA, 1983) e CL (BRENER, 1965) de *Trypanosoma cruzi*, gentilmente fornecidos pelo Dr. Cláudio Silva – Universidade Federal de Uberlândia, foram mantidos em cultura *in vitro* para realização dos experimentos deste estudo. As formas epimastigotas de ambas as cepas foram mantidas em meio Liver Infusion Tryptose-LIT (3,6g NaCl, 0,36g KCl, 13,59g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 4,5g Triptona, 4,5g Infusão de Fígado, 10mg/mL Hemina, 10mL Glicose 20%, 900mL H<sub>2</sub>O q.s.p., pH=7,2) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina 10.000 U.I/ml e estreptomicina 10 mg/ml) em B.O.D (Biochemical Oxygen Demand) a 28°C.

A obtenção de formas tripomastigotas metacíclicos (TMs) foi realizada através do envelhecimento de culturas de epimastigotas (EPI) em meio LIT não suplementado por período aproximado de duas semanas e utilizados para infecção de células Vero.

Células Vero infectadas com as cepas G e CL foram cultivadas em meio RPMI 1640 Gibco® pH=7,2, suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina 10.000 U.I/ml e estreptomicina 10 mg/ml) e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

Tripomastigotas derivados de cultura de tecido (TCTs) foram obtidos através de coleta do sobrenadante da eclosão de células Vero previamente infectadas.

As formas amastigotas extracelulares (AEs) foram obtidas após a incubação de TCTs em meio LIT pH=5,8 suplementado com 5% SFB e 1% de antibiótico (penicilina 10.000 U.I/ml-estreptomicina 10mg/ml) e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub> por período de 12 a 16 horas.

As formas amastigotas extracelulares (AEs) foram obtidas após a incubação de TCTs em meio LIT pH=5,8 suplementado com 5% SFB e 1% de antibiótico (penicilina 10.000 U.I/ml-estreptomicina 10mg/ml) e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub> por período de 12 a 16 horas.

### 3.3. Ensaios de citotoxicidade

As concentrações de uso dos inibidores utilizados foram estabelecidas e padronizadas de acordo com as indicações do manual do fabricante Cayman Chemical®, ver tabela 1.

Os possíveis efeitos citotóxicos dos inibidores foram então avaliados através do método de redução de Resazurina, em triplicata para cada concentração, utilizando Resazurin (Sigma-Aldrich®) A resazurina é um sal de sódio de coloração azul, fracamente fluorescente e redutível a resorufina, um corante róseo com alta fluorescência em vermelho. Esse sal é reduzido nas mitocôndrias e é dependente da enzima NADPH desidrogenase, NADPH ou NADH que reduzem resazurina a resorufina (RISS *et al.*, 2013). Dessa forma, esse composto foi utilizado para avaliar a viabilidade celular de acordo com sua capacidade de conversão e mudança de coloração do meio, quando submetido a diversos tratamentos com inibidores.

Em uma placa de poliestireno de 96 poços ((Kasvi®), área = 0,33 cm<sup>2</sup>) foi distribuída a suspensão de 200µl/poço de meio RPMI contendo 2x10<sup>5</sup> células HeLa. Esta placa foi incubada *overnight* em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub> para adesão das células. Estas foram, então, tratadas com as concentrações de inibidores pré-estabelecidas por um período igual a 1 hora em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. Um controle negativo, no qual as células foram tratadas por 1 hora com uma concentração tóxica a 3,2M de Dimetilsulfóxido (DMSO) Sigma-Aldrich®, e um controle sem tratamento foram adicionados. Após lavagem do tratamento com PBS 1X, 100 µl de meio RPMI foi adicionado seguido de um volume de 20 µl de solução de Resazurina 0,15 mg/ml e a placa foi incubada *overnight* em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, a absorbância

foi lida no equipamento VersaMax™ Tunable Microplate Reader (Molecular Devices), em um comprimento de onda de 560nm excitação/590nm emissão (adaptado de RISS *et al.*, 2016). Três experimentos distintos foram realizados para cada inibidor.

A citotoxicidade dos inibidores foi estabelecida de acordo com a média da absorbância do controle positivo de cada experimento, considerando este último como viabilidade de cem por cento.

**Toxicidade** = 100 x (Média absorbância – Média da absorbância controle) / Média do controle

**Viabilidade** = 100 – Toxicidade

**Tabela 1. Inibidores, seus alvos e concentrações de uso padronizadas, segundo indicações do manual do fabricante Cayman Chemical®**

Inibidor	Quinase Alvo	Concentrações Padronizadas			CAS Nº
<b>Selumetinib</b>	MEK1 e ERK1/2	10 µM	20 µM	-	606143-52-6
<b>SB203508</b>	p38	10 mM	20 mM	-	152121-47-6
<b>JNK inhibitor V</b>	JNK	2 µM	4 µM	-	894804-07-0
<b>ERK inhibitor</b>	ERK	310 nM	620 nM	1 µM	865362-74-9
<b>EGFR inhibitor</b>	EGFR	10 nM	21 nM	42 nM	879127-07-8

### 3.4. Ensaios de Invasão

$2 \times 10^5$  células HeLa foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro estéreis redondas Knittel® (13 mm), em placas de poliestireno de 24 poços ((Kasvi®, área = 1,93 cm<sup>2</sup>) e incubadas *overnight* em estufa a 37 °C, com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

As células receberam tratamento com os inibidores especificados na tabela 1 por uma 1 hora, em triplicata. Após o o tratamento, as células foram lavadas com PBS 1X para remoção do excesso de inibidor e incubadas com suspensões de AEs das cepas G e CL nas proporções de 10 e 20 parasitas por célula HeLa, respectivamente. Após o período de interação de 2h em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X para a remoção de parasitas não internalizados.

A fixação das células foi realizada utilizando solução Bouin (Sigma-Aldreich®) (0,9 de ácido pícrico, 9 % formaldeído e 5 % de ácido acético) por 15 minutos. Após quatro lavagens com PBS 1X, as células foram coradas com Giemsa (Sigma-Aldreich®) (35µl/ml) diluído em

água por 35 minutos e, então, descoradas em bateria de acetona + xilol (1. acetona 100%; 2. acetona 100%; 3. acetona-xilol 9:1; 4. acetona-xilol 7:3; 5. xilol 100%).

As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro com Permount (Fisher Chemical®) e, após a secagem, analisadas sob microscopia óptica com objetiva UPlanFl 100x/1.30 com o auxílio o software QCapture Pro 6.0 233 para captura das imagens. A contagem dos parasitos internalizados foi feita com auxílio do software ImageJ. Os ensaios de invasão para cada tratamento com inibidor específico foram realizados em duplicata ou triplicata.

### 3.5. Ensaios de Sinalização para Western Blot

$3 \times 10^6$  células HeLa foram plaqueadas em placas de cultura (Kasvi®) (87.8mm) e cultivadas *overnight* em RPMI 1640 Gibco® pH 7,4 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico (penicilina 10.000 U.I/ml e estreptomicina 10mg/ml) a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de aderência, o sobrenadante foi descartado e três incubações de 15 minutos com RPMI sem soro (R0) foram feitas e a placas foram incubadas *overnight* a 37 °C em meio R0 com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub> para o período de starving. Posteriormente, o R0 foi removido e novo R0, sem antibiótico, contendo AEs numa proporção de 10 parasitos por célula (cepa G e CL) cepa foi adicionado. As células foram incubadas com parasitos por 1, 5, 15, 30, 60, 90 ou 120 minutos. Um controle sem a incubação com parasitas (0 minutos) e um controle submetido à exposição a meio com 10% SFB por 120 foram incluídos. Após o período de incubação, as placas foram lavadas sob gelo três vezes com PBS 1x gelado contendo 0,5 M Ortovanadato de Sódio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) diluído 500X para remoção dos parasitas. 300µl do coquetel de lise (Triton X-100 1%; NaCl 150mM; Tris-HCl 50mM pH 7,4) e Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM e inibidores de protease (Sigma Fast, Sigma-Aldrich®) além de inibidores de fosfatase (PhosSTOP, Sigma-Aldrich®) foram adicionados à placa e as células mecanicamente removidas com *cell scraper* estéril (Costar®) para extração proteica. O extrato celular foi, então, recolhido em um microtubo e este incubado por 30 minutos a 4°C, centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante resultante foi recolhido para quantificação e armazenado a -80° Celsius.

### 3.6. Eletroforese em gel e Western Blot

Os extratos proteicos das amostras descritas no item 3.4 foram quantificados através do método de Ácido Bicinonínico (SMITH *et al.*, 1985) por meio do kit BCA Protein Assay (Boster®), resolvidos (30 µg proteína total) em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10% em tampão de amostra 4X (40% Glicerol, 240 mM Tris-HCl ph 6.8, 8% SDS, 0,04% Azul de

Bromofenol e DTT 0,049 M) e transferidos para membrana de nitrocelulose Amersham™ Protan™ 0,45 µm para análise da cinética da ativação proteica por Western blot.

As membranas foram coradas com Ponceau S (Imbralab®) para controle de transferência de proteínas. A partir da etapa de bloqueio, todas as etapas seguintes foram feitas na presença de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,5M na diluição 1:2.000, para impedir possível perda da fosforilação. Após a transferência, foi realizado bloqueio com PBS Tween 0,1% (PBST) e 5% de leite Nonfat Dry Milk (Cell Signalling®) por 2 horas, sob agitação, à temperatura ambiente. Em seguida ao bloqueio, foi realizada a incubação com os anticorpos primários, anti-pERK1/2 (Cell Signalling®), anti-pSrc (Cell Signalling®), anti-pAKT (Cell Signalling®), anti-pEGFR (Cell Signalling®), anti-pMEK1/2 (Cell Signalling®), anti-pMKP1 (Cell Signalling®) e anti-pp38 (Santa Cruz®), na diluição de 1:1000, *overnight* a 5° Celsius. Após três lavagens de 15 minutos, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado à peroxidase (Sigma®) (rabbit) na diluição de 1:2000 em PBS Tween 0,1% (PBST) e 1% de leite Nonfat Dry Milk (Cell Signalling®) por 1 hora, sob agitação, à temperatura ambiente. A proteína constitutiva β-actina foi utilizada como normalizadora.

Devido ao peso molecular parecido com algumas das proteínas estudadas, foi feita a remoção dos anticorpos primários e secundários (“stripping”) de algumas das membranas apresentadas neste estudo. Esse processo foi realizado por meio da incubação das membranas em solução de “stripping” (Glicina 0,2M; NaCl 0,2M pH 2,8) por 30 minutos e adição de 625µl de solução de NaOH 1N por mais 30 minutos de incubação. Em seguida, foram feitas três lavagens de 10 minutos com TBS Tween (TBST) 0,01%, todos esses processos sob agitação. Após as lavagens, as membranas foram bloqueadas por 1 hora com TBST e 5% de leite Nonfat Dry Milk (Cell Signalling®). Seguido ao bloqueio, foi realizada incubação com o anticorpo anti-β-actina em diluição 1:5000. A incubação com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase anti-IgG (mouse) da Sigma® foi realizada como já descrito anteriormente.

A detecção das bandas foi realizada com o kit Lumigen PS-3 280 Detection Reagent (GE®) no equipamento GE Healthcare Life Sciences ImageQuant LAS 4000.

Todos os anticorpos utilizados durante os experimentos de Western Blot estão especificados na tabela 2.

**Tabela 2. Anticorpos Primários utilizados durante a etapa de Western Blot**

Proteína alvo	Anticorpos Primários	Fabricante	Resíduo de fosforilação	Fonte	Peso molecular
MKP1	anti-p-DUSP1/MKP1	Cell signaling®	Ser359	coelho	40 kDa
ERK 1/2	anti-p44/42 MAPK	Cell signaling®	Thr202/Tyr204	coelho	42, 44 kDa
AKT	anti-p-AKT	Cell signaling®	Ser473	coelho	60 kDa
MEK 1/2	anti-pMEK1/2	Cell signaling®	Ser217/221	coelho	44, 42 kDa
SRC	anti-pSRC family	Cell signaling®	Tyr416	coelho	60 kDa
AKT	anti-p-AKT	Cell signaling®	Thr308	coelho	60 kDa
p38	anti-p-p38	Santa Cruz®	Tyr182	coelho	38 kDa
EGFR	anti-p-EGFR	RabMab®	Tyr1068	coelho	135 kDa
$\beta$ -actina	anti- $\beta$ -actina	Sigma Aldrich®	-	camundongo	42 kDa

### 3.7. Seleção de citocinas e fatores de transcrição

Foram selecionadas citocinas e fatores de transcrição expressos em célula HeLa para se estabelecer a modulação das mesmas, usando PCR quantitativo, durante a invasão dos parasitos. Baseado no genoma e transcriptoma de HeLa disponibilizado, notamos que esse tipo celular não expressa algumas interleucinas e citocinas regulatórias, incluindo IL-10 e outras citocinas inflamatórias, como por exemplo IFN- $\gamma$  (LANDRY *et al.*, 2013). Há indícios de que em diferentes linhagens de células epiteliais, o gene de IL-10 seja silenciado devido à metilação nas ilhas CpG que impedem, portanto, sua expressão (SZALMÁS *et al.*, 2008). Neste contexto, citocinas e interleucinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias foram selecionadas para serem avaliadas no presente estudo, baseadas em sua função durante o processo imunológico e expressão em células HeLa (BORISH; STEINKE, 2003; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Para a seleção dos fatores transcricionais avaliados, foram consideradas moléculas ativadas pela via de MAPK mediante estímulos, patógenos e condições diversas: TNF- $\alpha$  (KYRIAKIS, 1999), chumbo divalente (Pb<sup>2+</sup>) (LIN *et al.*, 2015), *Candida albicans* (MOYES *et al.*, 2010), leptina (MIN *et al.*, 2018), *Leishmania donovani* (BALARAMAN *et al.*, 2005), radiação ionizante (HU *et al.*, 2018) e que os mesmos fossem expressos por células HeLa (LANDRY *et al.*, 2013).

### 3.8. Desenho de iniciadores para PCR quantitativo (qPCR)

A plataforma online gratuita National Center for Biotechnology Information (NCBI) foi utilizada para seleção das sequências de mRNA utilizadas como base para o desenho dos iniciadores de fatores de transcrição e citocinas/interleucinas.

Após a seleção das sequências, estas foram, então, analisadas utilizando uma extensão da plataforma, o PrimerBlast, onde foi realizado o desenho dos iniciadores de acordo as características desejadas. Após o desenho, cada iniciador foi testado em um programa online chamado NetPrimer para conteúdo GC, T<sub>m</sub>, formação de dímeros, etc.

O programa Amplify™ versão 1.2 foi utilizado para checar os locais de anelamento dos iniciadores no genoma e no cDNA e o tamanho aproximado do produto de amplificação. Os iniciadores foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies - IDT®. As sequências dos iniciadores utilizados estão descritas na tabela 5.

### 3.9. Ensaio de sinalização para PCR em tempo real (RT-PCR)

$3 \times 10^6$  células HeLa foram plaqueadas em placas de cultura (Kasvi®) (87,8mm) e cultivadas *overnight* em RPMI 1640 (Gibco®), pH 7,4, suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico (penicilina 10.000 U.I/ml e estreptomicina 10mg/ml) a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após o período de aderência, o sobrenadante foi descartado e três incubações de 15 minutos com RPMI sem soro (R0) foram feitas e a placas foram incubadas *overnight* a 37 °C em meio R0, com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub> para o período de *starving*. Posteriormente, o R0 foi removido e novo R0, sem antibiótico, contendo AEs numa proporção de 10 parasitos por célula, para as cepas G e CL, foi adicionado. As células foram incubadas com parasitos por 30, 60 ou 120 minutos. Um controle sem a incubação com parasitas (0 minutos) e um controle submetido à exposição a meio com 10% SFB por 120 foram incluídos.

Após o período de incubação, as placas foram lavadas sob gelo três vezes com PBS 1x gelado para remoção dos parasitas. As células foram, então, removidas mecanicamente com o auxílio de “cell scraper” estéril (Costar®) e a extração de RNA total foi realizada utilizando-se TRIzol® LS reagente (Life technologies™). As amostras foram tratadas com

Deoxyribonuclease I (DNase I) (Invitrogen™) e quantificadas para conteúdo de RNA total com o auxílio do programa Thermo Scientific™ Nanodrop™.

### 3.10. Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, foi utilizado o kit High Capacity cDNA Reverse (Transcription Applied Biosystems®), de acordo com as orientações do fabricante. As amostras foram armazenadas em -20° C para utilização posterior em ensaios RT-PCR.

### 3.11. Reação de Cadeira de Polimerase - PCR Convencional

Os iniciadores utilizados para os experimentos de RT-PCR foram previamente testados para confirmação da amplificação das amostras de cDNA recém-sintetizados por meio de PCR convencional utilizando Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen™) (5 U/μl), 10x Green PCR Buffer (Fermentas- Pure Extreme®) e dNTPs Set Mix (Thermo Fisher Scientific®) (100 mM).

**Tabela 3. Mistura (Mix) para a Reação de Cadeira de Polimerase (PCR)**

Mix PCR	Volume (μl)
Tampão 10 X (Fast digest)	2
dNTPs Mix (2 mM)	2
Iniciador (10 μM)	1
Amostra 50 ng/μl	1
Água Ultra Pura Uniscience®	4
Volume total	20

**Tabela 4. Condições estabelecidas para Reação de Cadeira de Polimerase (PCR)**

ETAPA I	ETAPA II			ETAPA III	
Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Número de ciclos	Extensão Final
95°C por 5 minutos	95°C por 1 minuto	*	72°C por 1 minuto	35	72°C por 7 minutos

\*A fase de anelamento foi adaptada de acordo a temperatura específica de cada iniciador e tamanho do produto de amplificação.

As amostras foram corridas em gel de agarose 2% utilizando brometo de etídeo como intercalante para identificação das bandas lidasse o gel foi revelado sob fluorescência no aparelho GE Healthcare Life Sciences ImageQuant LAS 4000. O padrão de peso molecular de 100 pb (Sinapse Biotecnologia®) foi utilizado para indicação do peso molecular das bandas. Dados não mostrados.

### **3.12. Reação de Cadeia de Polimerase em tempo real (RT-PCR)**

O cDNA sintetizado a partir do RNA extraído de células HeLa foi utilizado nas reações de RT-PCR, juntamente a um mix contendo PowerUp™ SYBR™ GREEN Master Mix (Applied Biosystem®). Os níveis de expressão dos transcritos foram acessados com o auxílio do aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems®), assim como a padronização. Reações controle, sem a adição de cDNA foram incluídas.

Os genes constitutivos GAPDH e  $\beta$ -2-microglobulina foram utilizados para normalização. A expressão gênica foi analisada através do método comparativo do  $C_T$ , também conhecido por  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , sendo demonstrado como “fold change”, onde  $2^{-\Delta\Delta C_T} = [(C_T \text{ gene de interesse} - C_T \text{ normalizador}) \text{ Amostra} - (C_T \text{ gene de interesse} - C_T \text{ gene normalizador}) \text{ Amostra controle}]$ , ou seja, representa a relação de quantas vezes aquele alvo está positivamente ou negativamente regulado, em relação ao controle estabelecido (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Todas as amostras foram analisadas em duplicata. As curvas de dissociação dos iniciadores utilizados, obtidas através da leitura das amostras no aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems®), estão disponibilizadas no item Anexo I. Essas indicam que não houve formação de produtos inespecíficos para os iniciadores utilizados durante o experimento de RT-PCR.

**Tabela 5. Características dos iniciadores utilizados para experimentos de Reação de Cadeira de Polimerase (convencional e em tempo real)**

Alvo	Sequência		Temperatura de Anelamento	Tamanho produto de amplificação (pb)	
	Iniciador <i>Forward</i>	Iniciador <i>Reverse</i>		DNA Genômico	cDNA
TNF- $\alpha$	CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC	GCTTGAGGGTTTGCTACAACATG	60 °C	-	73
TGF- $\beta$	GAGCCTGGACACGCAGTACA	CCCGGGTTATGCTGGTTGT	60 °C	-	59
IL-6	TGCAGATGAGTACAAAAGTCCTGAT	GTGGTTATTGCATCTAGATTCTTTGC	60 °C	-	137
cFOS	GGGGCAAGGTGGAACAGTTAT	AGGTTGGCAATCTCGGTCTG	60 °C	-	181
ELK1	GGCTACGCAAGAACAAGACCA	CCTCAGGGTAGGACACAAACT	60 °C	-	132
GAPDH	GAAATCCCATCACCATCTTCCAGG	GAGCCCCAGCCTTCTCCATG	60 °C	490	122
$\beta$ -2-microglobulina	CACTGAATTCACCCCCACTGA	CTGCTTACATGTCTCGATCCCA	60 °C	-	104

### **3.13. Análises Estatísticas**

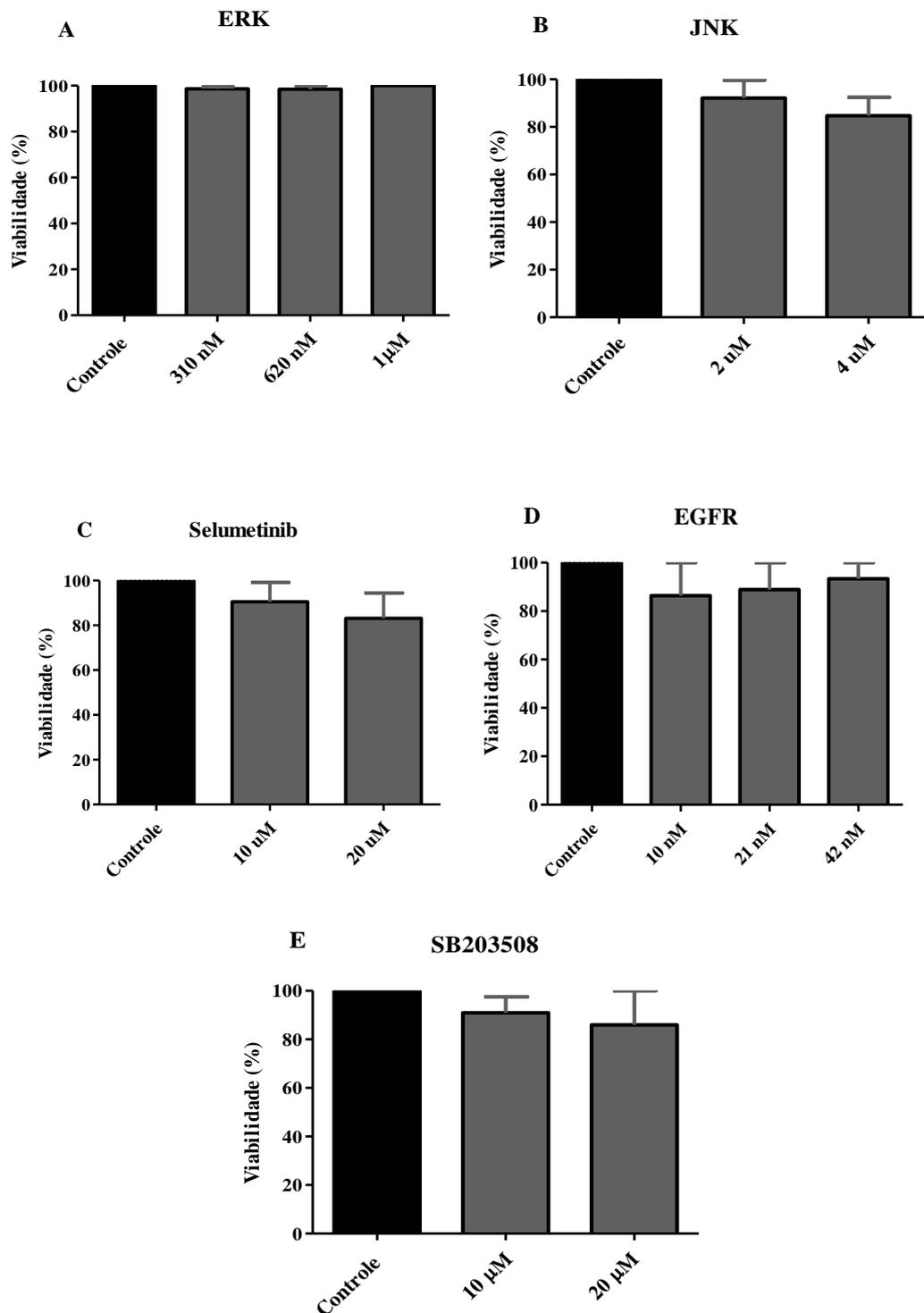
Foi realizada a avaliação dos dados para normalidade de distribuição (distribuição Gaussiana). Dados que apresentaram distribuição normal foram analisados pela análise de variância one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey. Quando os dados não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico correspondente, Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunns. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi inferior que 0,05. Dados expressos como média e desvio padrão. Para análise dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows (San Diego, Califórnia, USA).

## **4. Resultados**

### **4.1. Citotoxicidade dos inibidores**

As concentrações utilizadas foram previamente testadas em relação a sua citotoxicidade à linhagem de células Hela, modelo celular utilizado durante os experimentos de invasão, por meio de teste de redução de resazurina (item 3.3). A partir da oxidação da resazurina em resofurina, observada através de mudança de coloração roxo à rosado, e medida da absorbância, a viabilidade celular dos grupos tratados com diferentes concentrações dos inibidores utilizados foi comparada com um grupo de células controle que não recebeu o tratamento (Figura 5).

Não foi observada nenhuma alteração significativa na viabilidade celular para as concentrações das drogas inibidoras padronizadas.

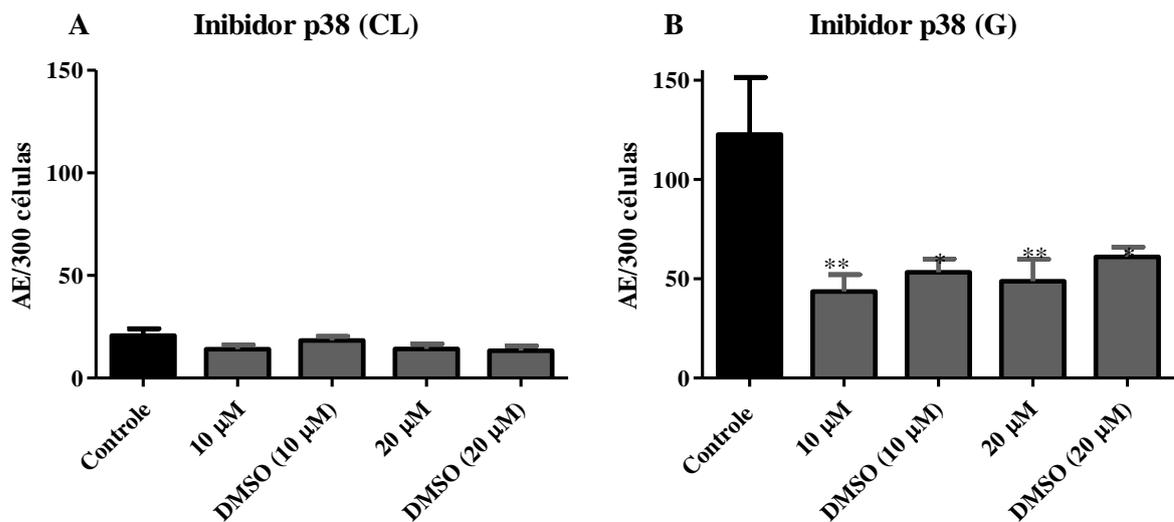


**FIGURA 5. Viabilidade celular após tratamento com inibidores. Células Hela tratadas (1h) com inibidores da via MAPK, em diferentes concentrações.** Controle corresponde ao não tratamento com inibidor. (A) Inibidor de ERK1/2 (310 nM, 620 nM 1 μM). (B) Inibidor de JNK–JNK V (2 μM e 4 μM). (C) Inibidor de MEK1 e ERK1/2-Selumetinib (10 μM e 20 μM). (D) Inibidor de EGFR (10 nM, 21 nM e 42 nM). (E) Inibidor de p38-SB203508 (10 μM e 20 μM). Colunas pretas = controle (sem tratamento). Colunas cinzas = tratamento com inibidor a uma concentração específica. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicata. Os dados foram avaliados por teste estatístico One-way ANOVA com pós-teste de Dunn's. Dados expressos como média e desvio padrão. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de  $p < 0,05$ . Nenhum dos experimentos apresentados demonstrou diferença estatisticamente significativa.

#### **4.2. Efeitos da inibição da via MAPK durante a invasão de Amastigotas Extracelulares (AEs) das cepas G e CL**

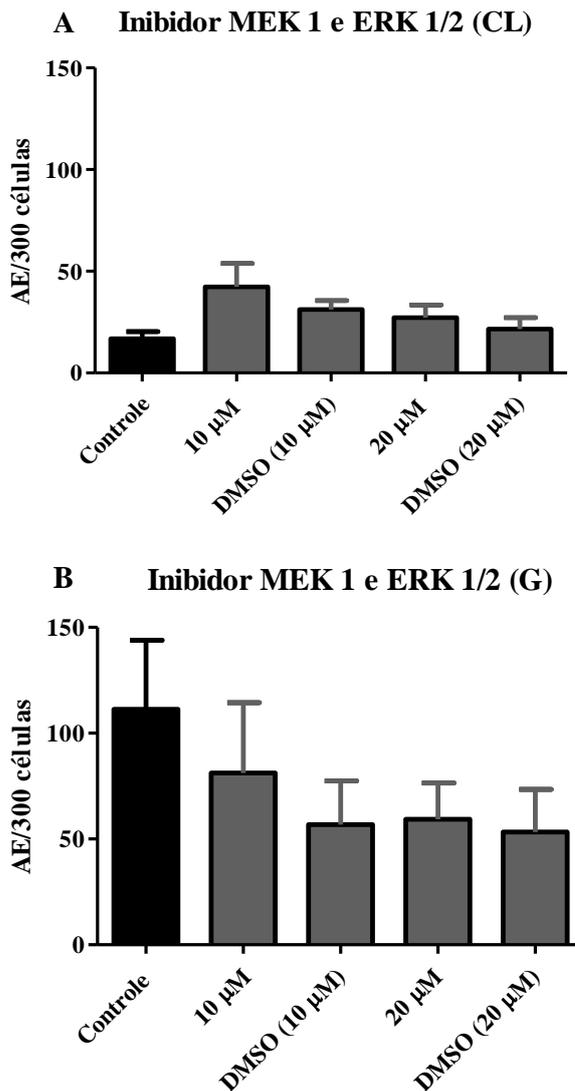
As cepas selecionadas para o presente estudo são características por apresentarem diferentes níveis de infectividade já comprovados, sendo AEs da cepa G são mais infectivos que AEs da cepa CL (MORTARA *et al.*, 1999). Com o objetivo de elucidar o envolvimento de proteínas quinases pertencentes à via MAPK e do receptor tirosina quinase EGFR na invasão dessas formas em células Hela, diferentes drogas inibitórias foram utilizadas em concentrações previamente testadas para efeitos de citotoxicidade nesse tipo celular (item 4.1). Esses experimentos foram realizados com uma proporção de 10 parasitos e 20 parasitos por célula, para as cepas G e CL, respectivamente. Além do controle que não recebeu tratamento, foram adicionados controles em que as células foram tratadas com a mesma proporção de diluente dos inibidores, DMSO.

Uma redução estatisticamente significativa na quantidade de AEs internalizados da cepa G em células Hela, quando submetidas à inibição da MAPK p38, foi observada em comparação ao controle para ambas concentrações utilizadas do inibidor SB203508 (10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M) (Figura 6B). Porém, o tratamento com DMSO nas mesmas proporções da diluição do inibidor demonstrou diminuição com significância estatística também quando comparados ao controle, podendo este estar influenciando na redução da internalização desses parasitos. Já para a cepa CL, diferenças significantes na taxa de internalização de parasitos não foram observadas (Figura 6A).



**Figura 6. Efeitos da inibição da MAPK p38 no número de amastigotas extracelulares (AEs) internalizados da Cepa CL e G.** Células Hela foram tratadas durante 1h em meio RPMI com inibidor de p38 (SB203508) nas concentrações de 10 µM e 20 µM. Em seguida, foram incubadas com formas AEs de *T. cruzi* por 2h – Cepa CL (MOI 20:1) e Cepa G (MOI 10:1). Parasitos internalizados foram contados sob microscopia óptica. Controle se refere a células sem tratamento com inibidores e grupos DMSO tiveram apenas DMSO sem droga adicionado ao meio na mesma proporção da diluição de cada concentração do inibidor. (A) Efeitos da inibição da MAPK p38 na internalização de AEs da cepa CL. (B) Efeitos da inibição da MAPK p38 na internalização de AEs da cepa G. As figuras A e B mostram os resultados referentes a dois ou três experimentos independentes feitos em triplicata. Estatísticas e gráficos foram feitos com o auxílio do programa Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados expressos como média e desvio padrão. Diferença estatisticamente significativa foram consideradas quando  $p < 0.05$ . Simbologia: \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  e \*\*\* $p < .001$ . Diferenças estatísticas apresentadas em (B) são em comparação ao controle.

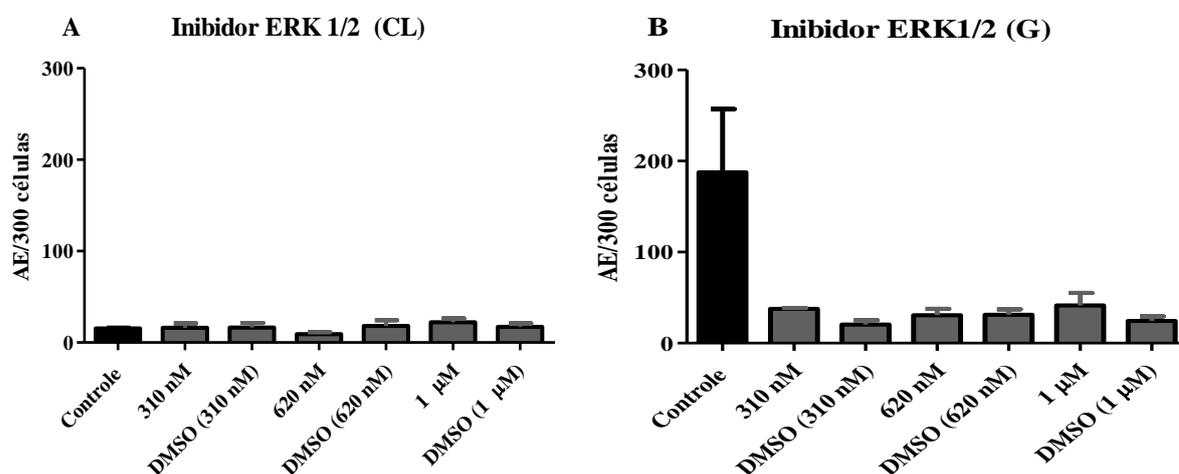
O inibidor Selumetinib é capaz de bloquear a ação de duas quinases simultaneamente, a MAP2K MEK1 e a MAPK ERK1/2. Não foi possível observar efeitos estatisticamente significantes resultantes da inibição dessas proteínas. No entanto, observa-se efeitos opostos para as duas cepas, há uma leve tendência ao aumento de AEs internalizados da cepa CL (Figura 7A) e a uma redução da entrada de AEs da cepa G (Figura 7B).



**Figura 7. Efeitos da inibição da MAPK ERK1/2 e da MAP2K MEK1 no número de amastigotas extracelulares (AEs) internalizados da Cepa CL e G.** Células Hela foram tratadas durante 1h em meio RPMI com inibidor de ERK1/2 e MEK1 (Selumetinib) nas concentrações de 10 µM e 20 µM. Em seguida, foram incubadas com formas AEs de *T. cruzi* por 2h – Cepa CL (MOI 20:1) e Cepa G (MOI 10:1). Parasitos internalizados foram contados sob microscopia óptica. Controle se refere a células sem tratamento com inibidores e grupos DMSO tiveram apenas DMSO sem droga adicionado ao meio na mesma proporção da diluição de cada concentração do inibidor. (A) Efeitos da inibição da MAPK ERK1/2 e da MAP2K MEK1 na internalização de AEs da Cepa CL. (B) Efeitos da inibição da MAPK ERK1/2 e da MAP2K MEK1 na internalização de AEs da Cepa G. As figuras de A e B mostram os resultados referentes a dois ou três experimentos independentes feitos em triplicata. Estatísticas e gráficos foram feitos com o auxílio do software Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados expressos como média e desvio padrão. Diferença estatisticamente significativa foram consideradas quando  $p < 0.05$ . Simbologia: \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

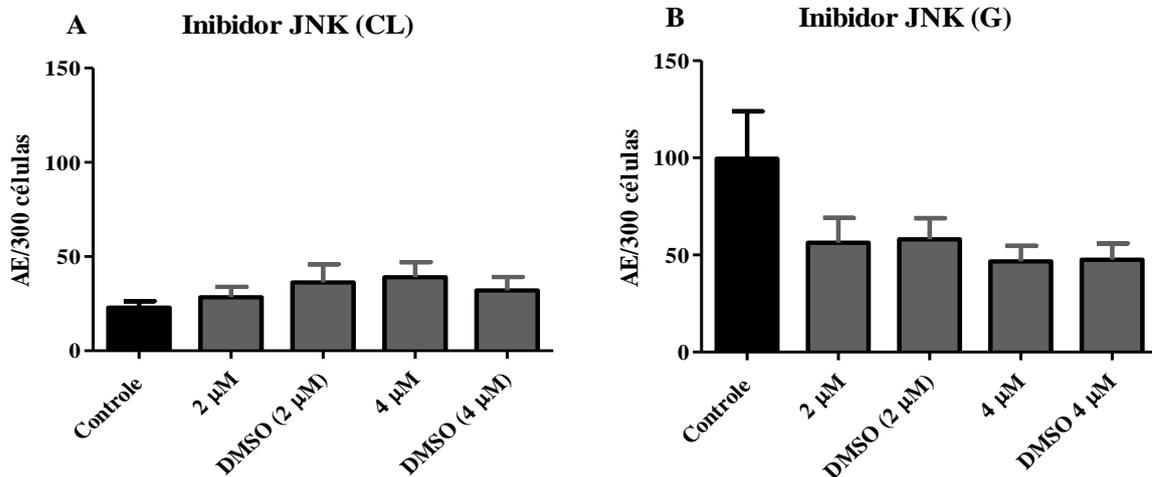


Baseados nos dados anteriores, um inibidor mais específico, “ERK inibidor”, que inibe apenas a MAPK ERK1/2 foi utilizado. Apesar dos dados não apresentarem diferenças estatisticamente significante, parece haver uma diminuição na internalização de AEs da cepa CL referente a concentração 620 nM utilizada da droga (Figura 8A). Porém, a inibição dessa quinase parece ter uma forte tendência da redução do número de parasitos internalizados da cepa G quando comparados ao controle, porém esses dados são referentes a um experimento único realizado em triplicata (Figura 8B) e novos experimentos com alvo na inibição dessa quinase precisam ser realizados para a confirmação do seu real efeito na internalização dessas formas.



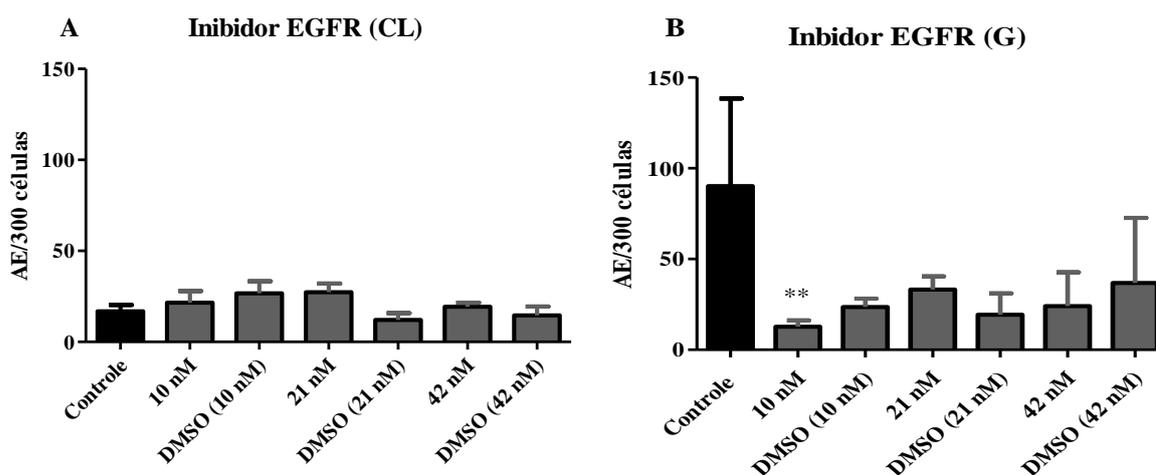
**Figura 8. Efeitos da inibição da MAPK ERK1/2 no número de amastigotas extracelulares (AEs) internalizados da Cepa CL e G.** Células Hela foram tratadas durante 1h em meio RPMI com inibidor de ERK1/2 (ERK inibidor) nas concentrações de 310 nM, 620 nM e 1 $\mu$ M. Em seguida, foram incubadas com formas AEs de *T. cruzi* por 2h – Cepa CL (MOI 20:1) e Cepa G (MOI 10:1). Parasitos internalizados foram contados sob microscopia óptica. Controle se refere a células sem tratamento com inibidores e grupos DMSO tiveram apenas DMSO sem droga adicionado ao meio na mesma proporção da diluição de cada concentração do inibidor. **(A)** Efeitos da inibição da MAPK ERK1/2 na internalização de AEs da Cepa CL. **(B)** Efeitos da inibição da MAPK ERK1/2 na internalização de AEs da Cepa G. As figuras de A e B mostram os resultados referentes a um ou dois experimentos independentes feitos em triplicata. Estatísticas e gráficos foram feitos com o auxílio do software Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados expressos como média e desvio padrão. Diferença estatisticamente significante foram consideradas quando  $p < 0.05$ . Simbologia: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

A inibição da MAPK JNK não demonstrou efeito estatisticamente significativo no número de parasitos internalizados. Porém, parece apresentar tendências opostas na internalização de AEs. Enquanto há um leve aumento na internalização de parasitos da cepa CL (Figura 9A) há um leve declínio de entrada de AEs para a cepa G (Figura 9B).



**Figura 9.** Efeitos da inibição da MAPK JNK no número de amastigotas extracelulares (AEs) internalizados da Cepa CL e G. Células Hela foram tratadas durante 1h em meio RPMI com inibidor de JNK (JNK inibidor V) nas concentrações de 2  $\mu$ M e 4  $\mu$ M. Em seguida, foram incubadas com formas AEs de *T. cruzi* por 2h – Cepa CL (MOI 20:1) e Cepa G (MOI 10:1). Parasitos internalizados foram contados sob microscopia óptica. Controle se refere a células sem tratamento com inibidores e grupos DMSO tiveram apenas DMSO sem droga adicionado ao meio na mesma proporção da diluição de cada concentração do inibidor. **(A)** Efeitos da inibição da MAPK JNK na internalização de AEs da Cepa CL. **(B)** Efeitos da inibição da MAPK JNK na internalização de AEs da Cepa G. As figuras de A e B mostram os resultados referentes a dois ou três experimentos independentes feitos em triplicata. Estatísticas e gráficos foram feitos com o auxílio do programa Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados expressos como média e desvio padrão. Diferença estatisticamente significativa foram consideradas quando  $p < 0.05$ . Simbologia: \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  e \*\*\* $p < .001$ .

O receptor tirosina quinase EGFR é uma das proteínas de superfície envolvidas na ativação da cascata que culmina na ativação de ERK1/2 (revisado em BYEON; KU; YANG, 2019). Visto que a inibição de ERK1/2 tende a reduzir a internalização de AEs da cepa G, fomos investigar se a inibição desse receptor apresentava algum efeito na infecção dessas formas. Foi observado que o bloqueio desse receptor também reduz a taxa de entrada de AEs da cepa G (Figura 10B), principalmente em baixas concentrações (10 nM), onde foi demonstrada significância estatística em comparação ao controle. Já para a cepa CL apesar de uma leve tendência de aumento da invasão, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes. Há uma redução da internalização na proporção de DMSO equivalente a 21 nM (Figura 10A), porém é provável que esta não reflita a realidade, sendo necessários novos experimentos para comprovar o real efeito desse inibidor sobre a internalização de formas AEs da cepa CL.



**Figura 10. Efeitos da inibição do receptor de crescimento epidermal (EGFR) no número de amastigotas extracelulares (AEs) internalizados da Cepa CL e G.** Células Hela foram tratadas durante 1h em meio RPMI com inibidor de EGFR (EGFR inhibitor) nas concentrações de 10 nM, 21  $\mu$ M e 42 nM. Em seguida, foram incubadas com formas AEs de *T. cruzi* por 2h – Cepa CL (MOI 20:1) e Cepa G (MOI 10:1). Parasitos internalizados foram contados sob microscopia óptica. Controle se refere a células sem tratamento com inibidores e grupos DMSO tiveram apenas DMSO sem droga adicionado ao meio na mesma proporção da diluição de cada concentração do inibidor. (A) Efeitos da inibição da EGFR na internalização de AEs da Cepa CL. (B) Efeitos da inibição da EGFR na internalização de AEs da Cepa G. As figuras de A e B mostram os resultados referentes a dois ou três experimentos independentes feitos em triplicata. Estatísticas e gráficos foram feitos com o auxílio do programa Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados expressos como média e desvio padrão. Diferença estatisticamente significante foram consideradas quando  $p < 0.05$ . Simbologia: \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  e \*\*\* $p < .001$ .

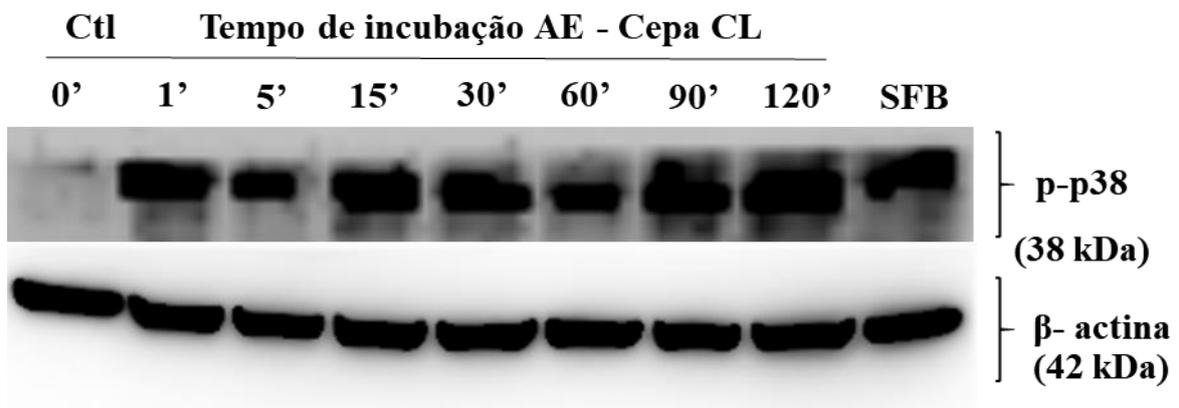
### **4.3. Cinética de ativação de proteínas quinases da via MAPK induzida por Amastigotas Extracelulares (AEs) das Cepas G e CL**

O perfil de ativação de proteínas quinases pertencentes a via MAPK e que se relacionam a ela foram avaliados por meio de técnica Western Blot em diferentes intervalos de tempo, e são apresentados a seguir. Os resultados apresentados mostram a indução da fosforilação de proteínas por formas amastigotas extracelulares (AEs) da cepa CL e G. Além dos grupos experimentais, em que ocorrem interações com parasitos, foram adicionados dois grupos controle: o grupo 0 minutos (0') que não foi incubado com parasitos e sem soro fetal bovino (SFB) e o grupo SFB que foi incubado durante 120 minutos com soro fetal bovino.

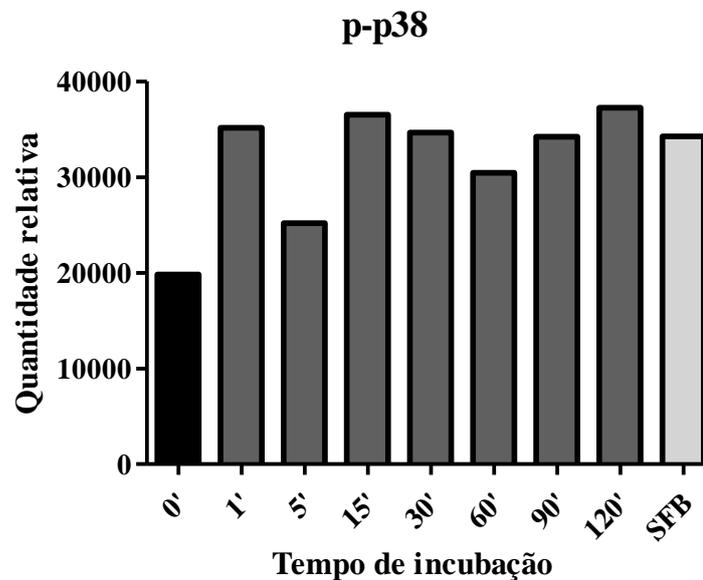
Em relação ativação da MAPK p38, pode-se notar que o contato com formas AEs da cepa CL (Figura 11) induz uma maior fosforilação da quinase, seguida de uma queda logo no início aos 5 minutos e novo aumento, aos 14 minutos e quando aos 60 minutos (60') de incubação tem um leve declínio e recuperação da fosforilação aos 90 minutos, que se mantém até os 120 minutos. Observa-se que a presença de SFB também é capaz de induzir fosforilação da via semelhante aos maiores tempos de ativação e, quando comparado ao controle (0 minutos), consideravelmente elevada. A fosforilação de p38 induzida por AEs da cepa G (Figura 12) é similar à do controle (0') até os 90 minutos (90') de incubação, onde há um aumento intenso de fosforilação em comparação aos outros tempos. O SFB também induziu fosforilação de p38 semelhante à maior ativação dessa proteína com interação de formas AEs da cepa G.

A indução da fosforilação da MAPK ERK1/2 por AEs ocorre de forma distinta para as cepas G e CL. AEs da cepa CL são capazes de induzir um aumento na fosforilação de ERK1/2 logo no primeiro minuto (1') de interação com os parasitos, em que esse nível de fosforilação continua aumentando e começa a declinar aos 90' (Figura 13). AEs da cepa G também induzem fosforilação dessa proteína logo no primeiro minuto (1') que se estende até os 5' de contato. No entanto, há uma perda de fosforilação considerável aos 15 minutos (15') e subsequente recuperação de ativação aos 30 minutos (30') e contínua ativação até os 90 minutos, com uma queda de ativação aos 120 minutos, momento em que o parasita já estaria completamente internalizado (Figura 14). Esses dados sugerem uma possível ativação bifásica da MAPK ERK1/2 quando em interação com formas AEs da cepa G, diferentemente do perfil de fosforilação induzido pela cepa CL. O SFB também induziu fosforilação ERK1/2 de semelhante à ativação dessa proteína aos 90 minutos (90') (Figura 14).

(A)

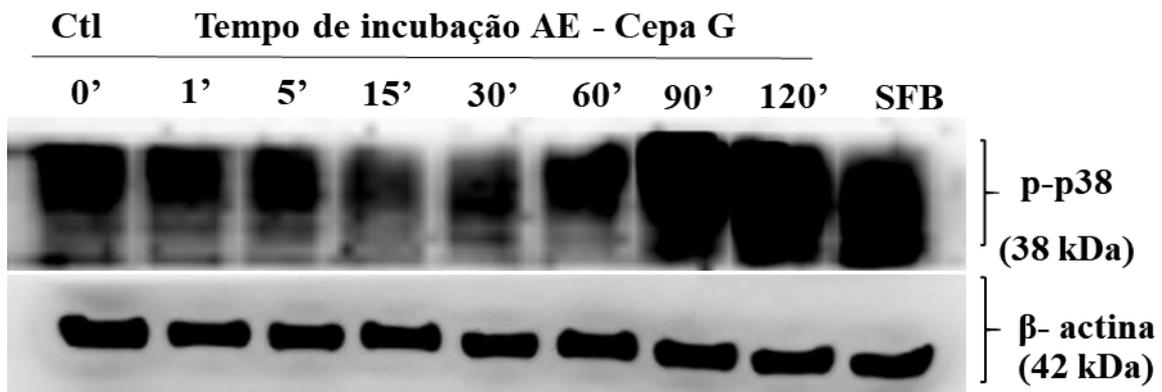


(B)

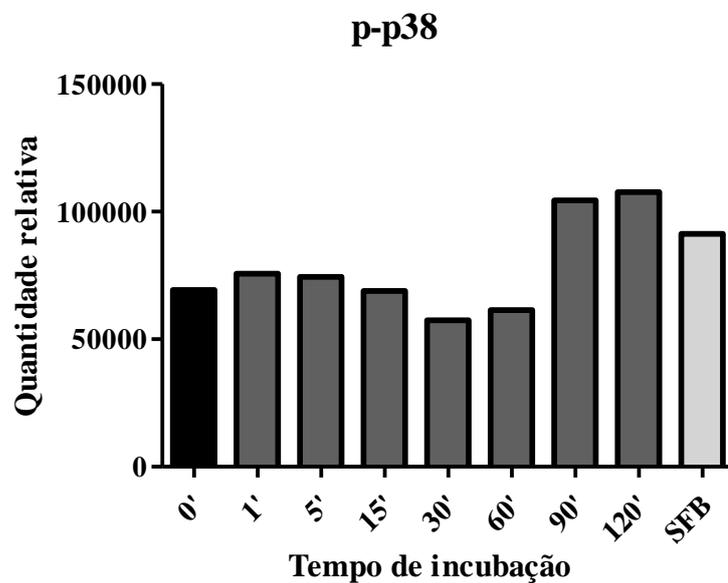


**Figura 11. Indução da fosforilação da proteína p38, pertencente a via MAPK, por formas AEs da cepa CL de *T. cruzi*.** (A) Cinética de fosforilação da proteína p38. Células Hela foram incubadas sem soro com AEs pelos tempos indicados (MOI 10:1). Tempo 0' corresponde ao controle (Ctl) sem interação com parasitos. Soro fetal bovino (SFB) corresponde a interação de células Hela com meio RPMI contendo 10% de SFB por 120 minutos. Lisados foram resolvidos em gel SDS-PAGE (30  $\mu$ g proteína total) e analisados por Western Blot com anticorpo p-p38 (Tyr 182). A proteína  $\beta$ -actina foi utilizada como normalizadora. (B) Dados expressos como quantidade relativa a proteína constitutiva  $\beta$ -actina. Gráficos foram criados com o auxílio dos programas ImageJ® e Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Diferença estatisticamente significante não foi constatada.

(A)

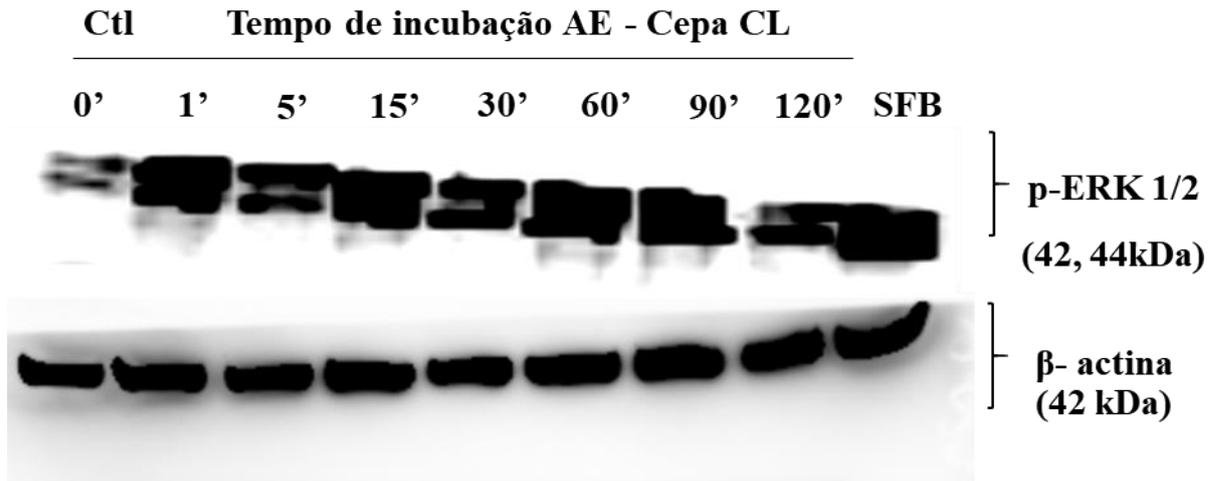


(B)

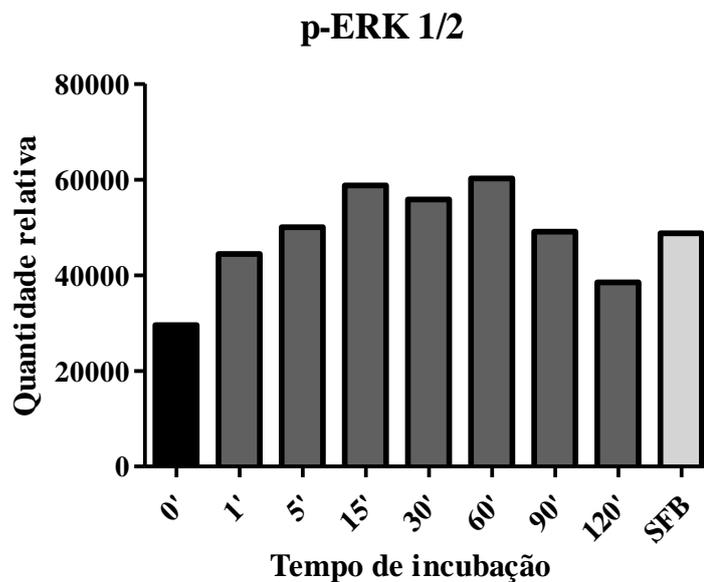


**Figura 12. Indução da fosforilação da proteína p38, pertencente a via MAPK, por formas AEs da cepa G de *T. cruzi*.** (A) Cinética de fosforilação da proteína p38. Células Hela foram incubadas sem soro com AEs pelos tempos indicados (MOI 10:1). Tempo 0' corresponde ao controle (Ctl) sem interação com parasitos. Soro fetal bovino (SFB) corresponde a interação de células Hela com meio RPMI contendo 10% de SFB por 120 minutos. Lisados foram resolvidos em gel SDS-PAGE (30 µg proteína total) e analisados por Western Blot com anticorpo p-p38 (Tyr 182). A proteína β-actina foi utilizada como normalizadora. (B) Dados expressos como quantidade relativa a proteína constitutiva β-actina. Gráficos foram criados com o auxílio dos softwares ImageJ® e Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Diferença estatisticamente significante não foi constatada.

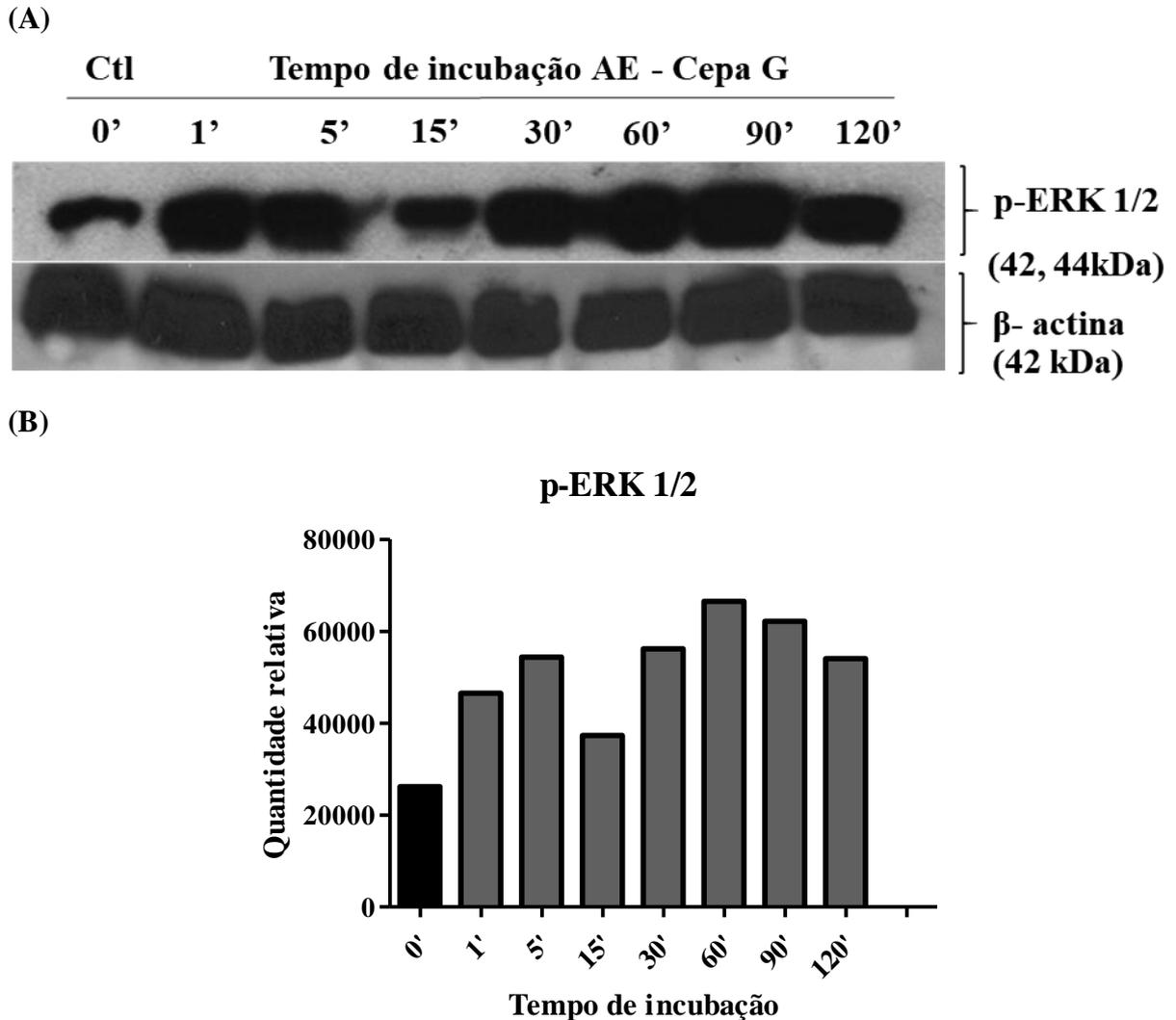
(A)



(B)



**Figura 13. Indução da fosforilação da proteína ERK1/2, pertencente a via MAPK, por formas AEs da cepa CL de *T. cruzi*.** (A) Cinética de fosforilação da proteína ERK1/2. Células Hela foram incubadas sem soro com AEs pelos tempos indicados (MOI 10:1). Tempo 0' corresponde ao controle (Ctl) sem interação com parasitos. Soro fetal bovino (SFB) corresponde a interação de células Hela com meio RPMI contendo 10% de SFB por 120 minutos. Lisados foram resolvidos em gel SDS-PAGE (30  $\mu$ g proteína total) e analisados por Western Blot com anticorpo p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204). A proteína  $\beta$ -actina foi utilizada como normalizadora. (B) Dados expressos como quantidade relativa a proteína constitutiva  $\beta$ -actina. Gráficos foram criados com o auxílio dos programas ImageJ® e Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Diferença estatisticamente significativa não foi constatada.

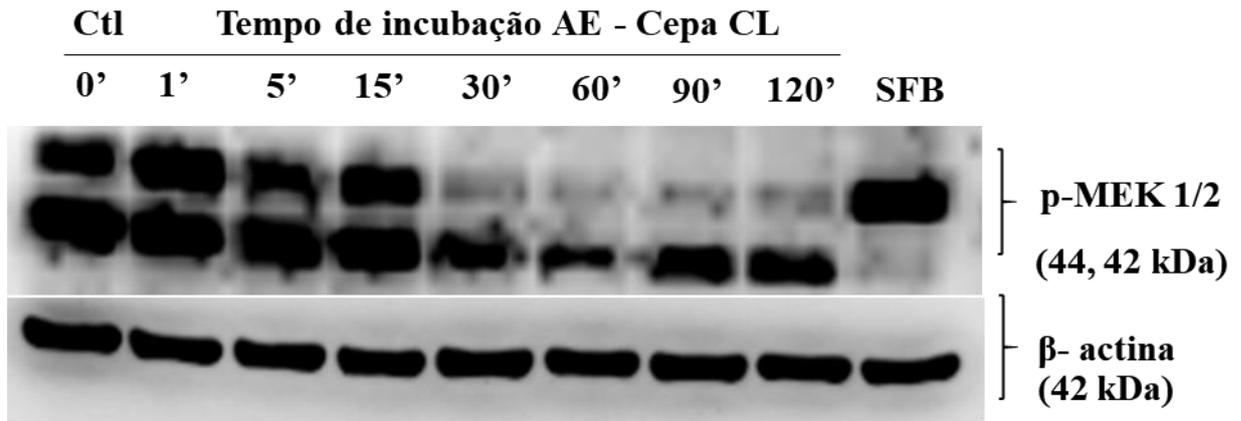


**Figura 14. Indução da fosforilação da proteína ERK1/2, pertencente a via MAPK, por formas AEs da cepa G de *T. cruzi*.** (A) Cinética de fosforilação da proteína ERK1/2. Células Hela foram incubadas sem soro com AEs pelos tempos indicados (MOI 10:1). Tempo 0' corresponde ao controle (Ctl) sem interação com parasitos. Soro fetal bovino (SFB) corresponde a interação de células Hela com meio RPMI contendo 10% de SFB por 120 minutos. Lisados foram resolvidos em gel SDS-PAGE (30 µg proteína total) e analisados por Western Blot com anticorpo p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204). A proteína β-actina foi utilizada como normalizadora. (B) Dados expressos como quantidade relativa a proteína constitutiva β-actina. Gráficos foram criados com o auxílio dos programas ImageJ® e Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Diferença estatisticamente significativa não foi constatada.

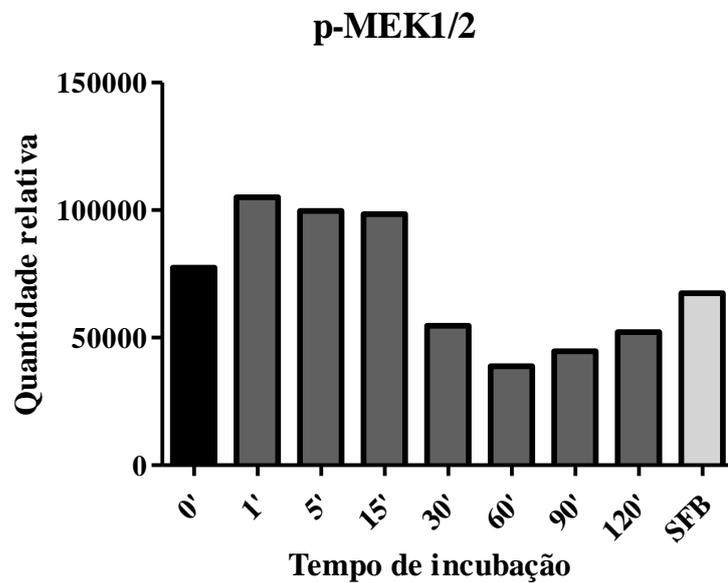
A MP2K MEK1/2, localizada “upstream” à MAPK ERK 1/2 age como ativadora dessa proteína durante a cascata de sinalização dessa via (revisado em LAHIRY *et al.*, 2010). A indução da fosforilação de MEK1/2 por AEs da cepa CL é estável até os 15 minutos (15’) de interação. Porém, a partir desse momento é notada a perda de fosforilação da proteína (MEK1), declínio que se mantém até os 120 minutos (120’) e também uma redução de fosforilação da isoforma (MEK2). Ainda, o SFB foi capaz de induzir a fosforilação apenas da isoforma MEK1 (Figura 15). Já AEs da cepa G mostraram um perfil de fosforilação parecido ao da MAPK ERK1/2, aumento da fosforilação logo no primeiro minuto de contato (1’) seguido de declínio na ativação e recuperação da fosforilação aos 30 minutos (30’), com aumento até os 90 minutos e novo declínio aos 120 minutos, tempo em que todos os parasitos já foram internalizados, confirmando a possibilidade de uma ativação bifásica para essa via (Figura 16).

Proteínas fosfatases, capazes de remover grupamentos fosfatos de proteínas revertendo o estado de fosforilação, agem como reguladoras da ativação de diversas quinases. MKP1, uma fosfatase que age sob a MAPK p38 desfosforilando e inativando essa proteína, também foi avaliada nesse estudo (revisado em SOARES-SILVA *et al.*, 2016). A ativação dessa fosfatase por AEs da cepa CL é baixa e relativamente estável até os 90 minutos (90’) de ativação, onde apresenta um pico alto de ativação, que é mantido aos 120 minutos (120’) (Figura 17). No entanto, a fosforilação da MAPK p38 não é afetada nesses tempos (Figura 11). O SFB induz a fosforilação dessa proteína similarmente ao pico de maior ativação da mesma. O perfil de ativação induzido por AEs da cepa G para essa fosfatase diferece daquele induzido para a cepa CL. A fosforilação de MKP1 é reduzida no primeiro minuto de contato (1’) e induzida aos 5’, apresentando uma queda durante os tempos 15 minutos (15’) e 30 minutos (30’) que é recuperada aos 60 minutos (60’), tempo de maior ativação, seguida por um decaimento de fosforilação (Figura 18). O perfil de ativação de MKP1 induzido por AEs da cepa G mostra um efeito de fosforilação bifásica similar ao encontrado para a MAPK ERK1/2 (Figura 14), porém essa fosfatase parece também não ter efeito sobre os níveis de fosforilação da MAPK p38 (Figura 12).

(A)

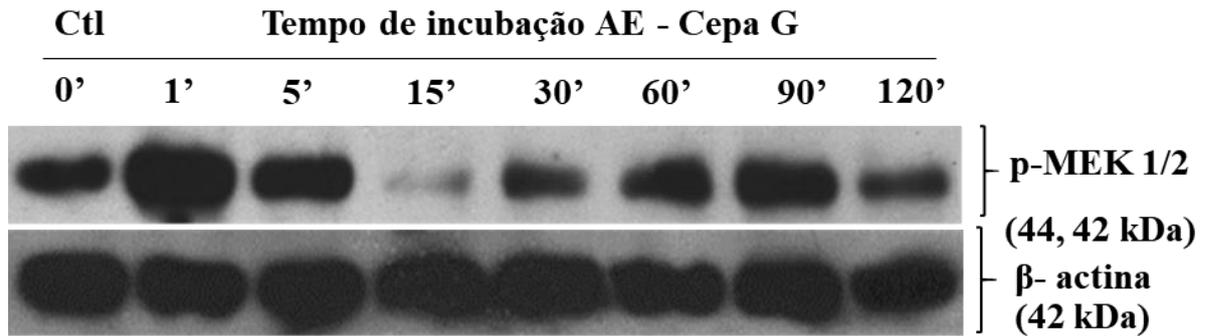


(B)

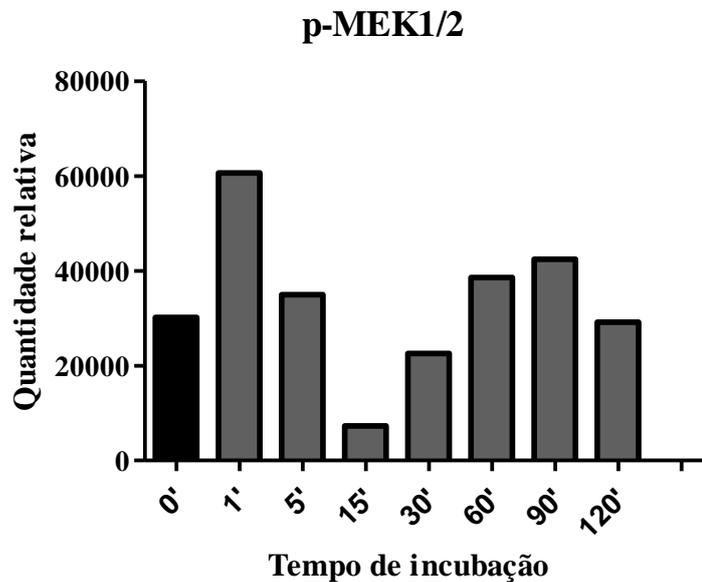


**Figura 15. Indução da fosforilação da proteína MEK1/2, pertencente a via MAPK, por formas AEs da cepa CL de *T. cruzi*.** (A) Cinética de fosforilação da proteína MEK1/2. Células Hela foram incubadas sem soro com AEs pelos tempos indicados (MOI 10:1). Tempo 0' corresponde ao controle (Ctl) sem interação com parasitos. Soro fetal bovino (SFB) corresponde a interação de células Hela com meio RPMI contendo 10% de SFB por 120 minutos. Lisados foram resolvidos em gel SDS-PAGE (30 µg proteína total) e analisados por Western Blot com anticorpo p-MEK1/2 (Ser217/221). A proteína β-actina foi utilizada como normalizadora. (B) Dados expressos como quantidade relativa a proteína constitutiva β-actina. Gráficos foram criados com o auxílio dos programas ImageJ® e Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Diferença estatisticamente significativa não foi constatada.

(A)

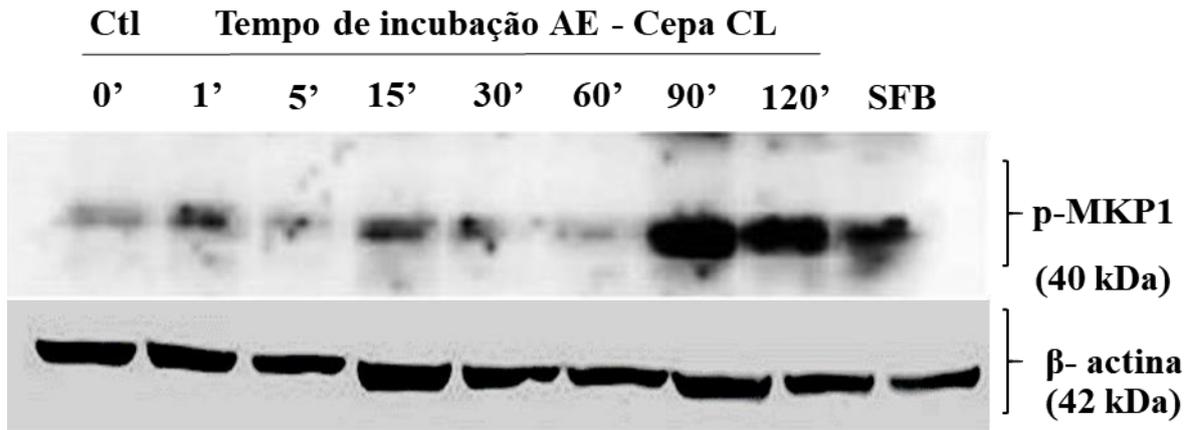


(B)

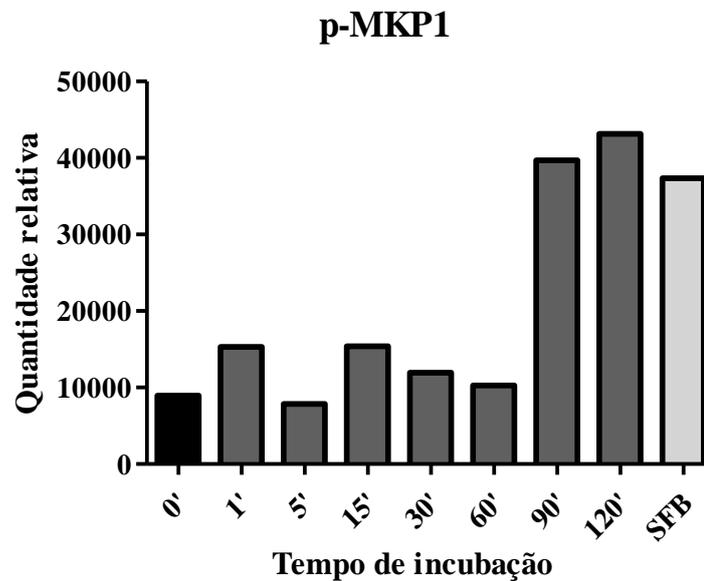


**Figura 16. Indução da fosforilação da proteína MEK1/2, pertencente a via MAPK, por formas AEs da cepa G de *T. cruzi*.** (A) Cinética de fosforilação da proteína MEK1/2. Células Hela foram incubadas sem soro com AEs pelos tempos indicados (MOI 10:1). Tempo 0' corresponde ao controle (Ctl) sem interação com parasitos. Soro fetal bovino (SFB) corresponde a interação de células Hela com meio RPMI contendo 10% de SFB' por 120 minutos. Lisados foram resolvidos em gel SDS-PAGE (30 µg proteína total) e analisados por Western Blot com anticorpo p-MEK1/2 (Ser217/221). A proteína β-actina foi utilizada como normalizadora. (B) Dados expressos como quantidade relativa a proteína constitutiva β-actina. Gráficos foram criados com o auxílio dos programas ImageJ® e Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Diferença estatisticamente significativa não foi constatada.

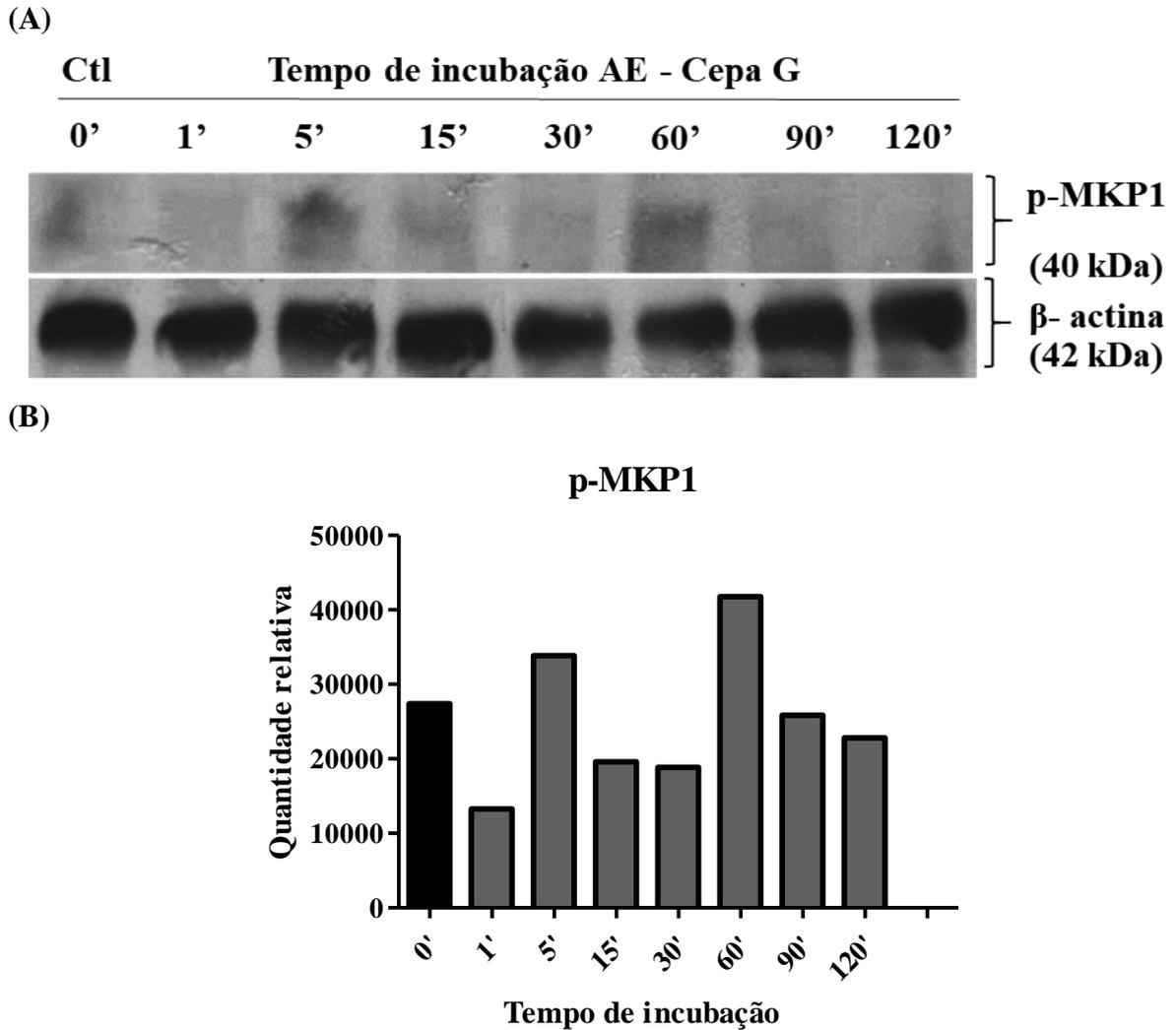
(A)



(B)



**Figura 17. Indução da fosforilação da proteína MKP1, fosfatase que age sobre p38, por formas AEs da cepa CL de *T. cruzi*.** (A) Cinética de fosforilação da proteína MKP1 (fosfatase). Células Hela foram incubadas sem soro com AEs pelos tempos indicados (MOI 10:1). Tempo 0' corresponde ao controle (Ctl) sem interação com parasitos. Soro fetal bovino (SFB) corresponde à interação de células Hela com meio RPMI contendo 10% de SFB' por 120 minutos. Lisados foram resolvidos em gel SDS-PAGE (30  $\mu$ g proteína total) e analisados por Western Blot com anticorpo p-MKP1 (Ser359). A proteína  $\beta$ -actina foi utilizada como normalizadora. (B) Dados expressos como quantidade relativa a proteína constitutiva  $\beta$ -actina. Gráficos foram criados com o auxílio dos programas ImageJ® e Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Diferença estatisticamente significativa não foi constatada.



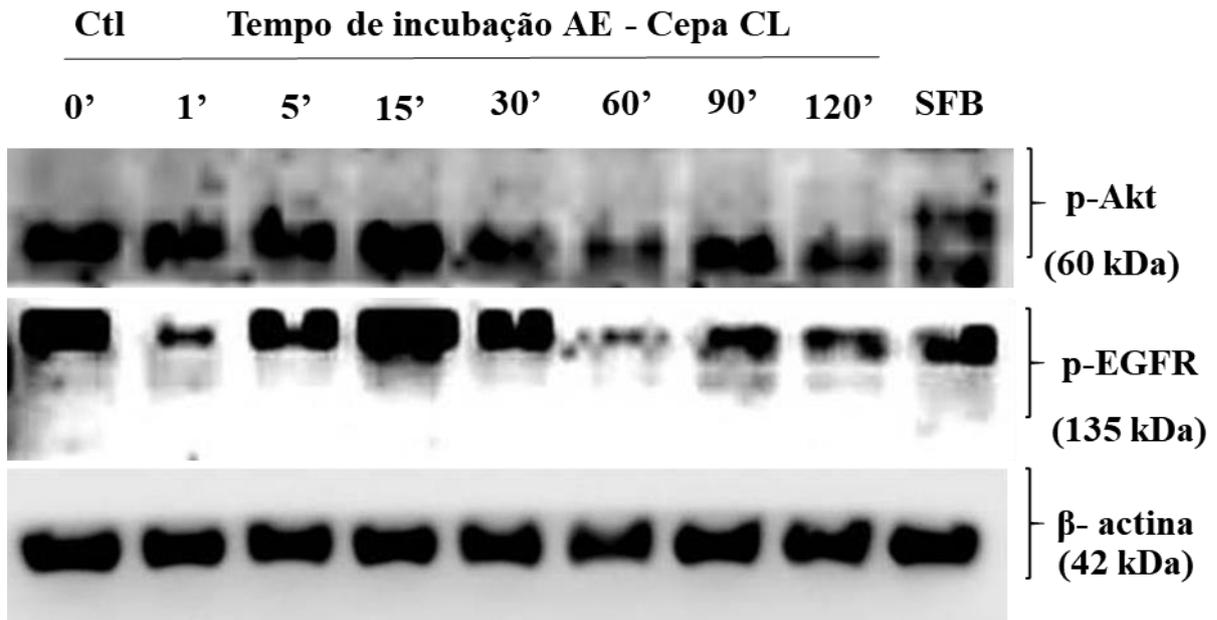
**Figura 18. Indução da fosforilação da proteína MKP1, fosfatase que age sobre p38, por formas AEs da cepa G de *T. cruzi*.** (A) Cinética de fosforilação da proteína MKP1 (fosfatase). Células Hela foram incubadas sem soro com AEs pelos tempos indicados (MOI 10:1). Tempo 0' corresponde ao controle (Ctl) sem interação com parasitos. Soro fetal bovino (SFB) corresponde à interação de células Hela com meio RPMI contendo 10% de SFB por 120 minutos. Lisados foram resolvidos em gel SDS-PAGE (30 µg proteína total) e analisados por Western Blot com anticorpo p-MKP1 (Ser359). A proteína β-actina foi utilizada como normalizadora. (B) Dados expressos como quantidade relativa a proteína constitutiva β-actina. Gráficos foram criados com o auxílio dos programas ImageJ® e Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Diferença estatisticamente significante não foi constatada.

A fosforilação e consequente ativação do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), um receptor pertencente à família de proteínas tirosina quinases e um dos principais receptores responsáveis pelo desencadeamento da ativação da MAPK ERK 1/2 (revisado em BYEON; KU; YANG, 2019), foi avaliada. AEs da cepa CL levam a uma maior ativação de EGFR aos 15 minutos (15'), mas esse estado de fosforilação não é mantido durante o restante dos tempos (Figura 19) indicando que outras vias possam talvez ativar a cascata de sinalização da via MAPK ERK1/2, mediante a interação com os parasitos dessa cepa. A fosforilação de EGFR mediada por AEs da cepa G mostra que o há um perfil fosforilação bifásica durante a ativação desse receptor, semelhante ao que ocorrer com a ativação de ERK 1/2 (Figura 14). Observa-se uma ativação aos 5 minutos (5'), que é recuperada aos 15 minutos (15'), seguida por uma queda da fosforilação aos 30 minutos (30'). Essa fosforilação apresenta uma segunda redução aos 60 minutos (60') e é restaurada aos 120 minutos de contato com AEs da cepa G (Figura 21). SFB também induz a ativação de EGFR.

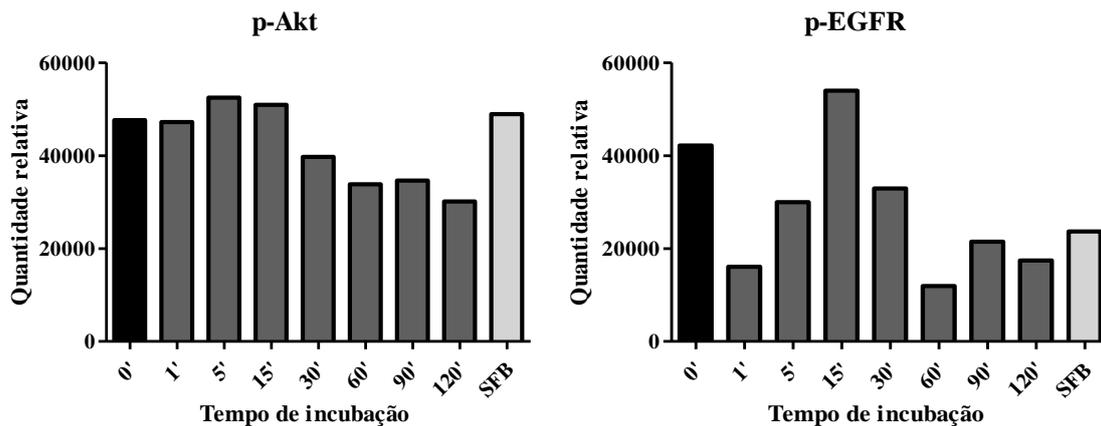
A serina/treonina quinase AKT é uma proteína citosólica capaz de regular a ativação da via através do controle da fosforilação e inativação de proteínas anteriores na cascata como a MAP3K Raf que leva a ativação do eixo Raf-MEK-ERK1/2 (MENGES; MCCANCE, 2008). Foi constatada apenas um leve aumento de fosforilação dessa proteína nos tempos 5 minutos (5') e 15 minutos (15') quando em contato com AEs da cepa CL, seguido de um decaimento de fosforilação inferior ao controle (0') (Figura 19). AEs da cepa G demonstraram um perfil de fosforilação similar ao do controle nos tempos 5 minutos (5'), 30 minutos (30') e 60 minutos (60'). SFB apresentou fosforilação parecida a do controle (0') (Figura 20).

Quando observamos a fosforilação de Src, uma tirosina quinase citoplasmática que fosforila MAP3K Raf levando à ativação dessa proteína (CHANG *et al.*, 2003), é possível notar que um há perfil de ativação semelhante entre as duas cepas (CL e G) para essa quinase. É observada uma maior fosforilação logo que AEs são colocados em contato com a célula (1'), mas que este perfil não se sustenta no decorrer do tempo, apesar de mostrar um leve aumento na fosforilação aos 90' minutos (90') e aos 120', para as cepas CL e G, respectivamente (Figuras 22 e 23). SFB induziu ativação parecida ao do controle (0').

(A)

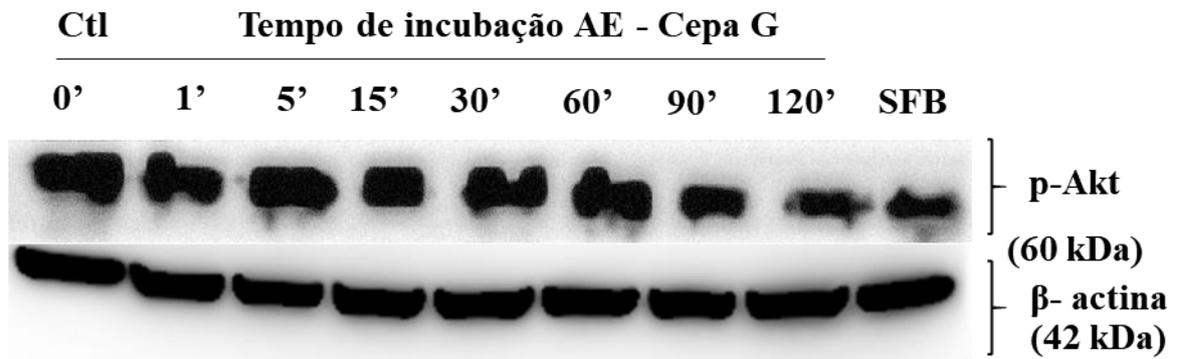


(B)

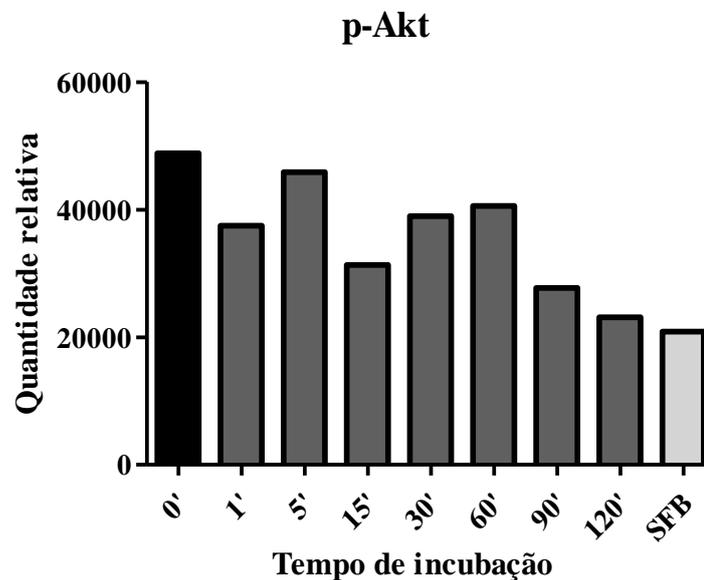


**Figura 19. Indução da fosforilação da proteína serina/treonina quinase Akt e do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) por formas AEs da cepa CL de *T. cruzi*.** (A) Cinética de fosforilação proteína serina/treonina quinase Akt e do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR). Células Hela foram incubadas sem soro com AEs pelos tempos indicados (MOI 10:1). Tempo 0' corresponde ao controle (Ctl) sem interação com parasitos. Soro fetal bovino (SFB) corresponde à interação de células Hela com meio RPMI contendo 10% de SFB por 120 minutos. Lisados foram resolvidos em gel SDS-PAGE (30 µg proteína total) e analisados por Western Blot com anticorpo p-Akt (Thr308) e p-EGFR (Tyr1068). A proteína β-actina foi utilizada como normalizadora. (B) Dados expressos como quantidade relativa a proteína constitutiva β-actina. Gráficos foram criados com o auxílio dos programas ImageJ® e Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Diferença estatisticamente significativa não foi constatada.

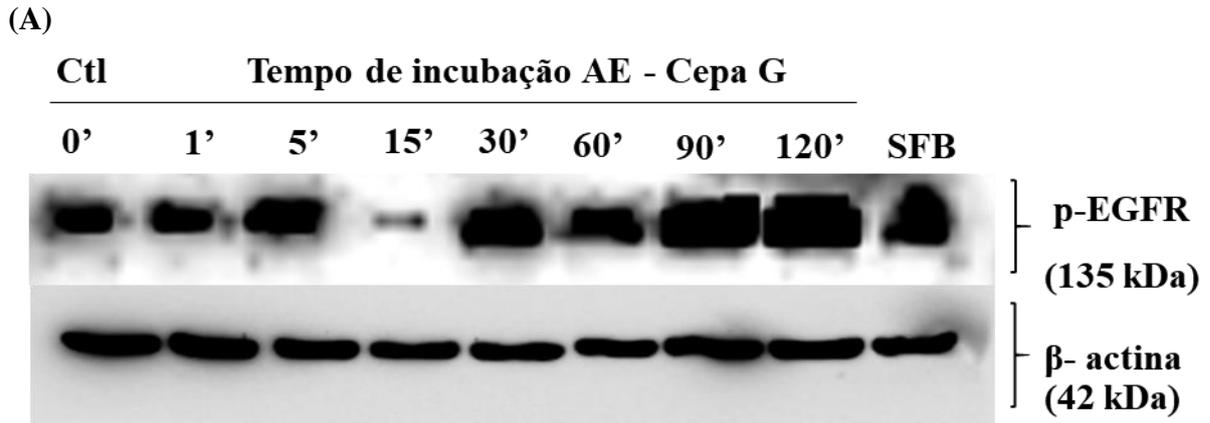
(A)



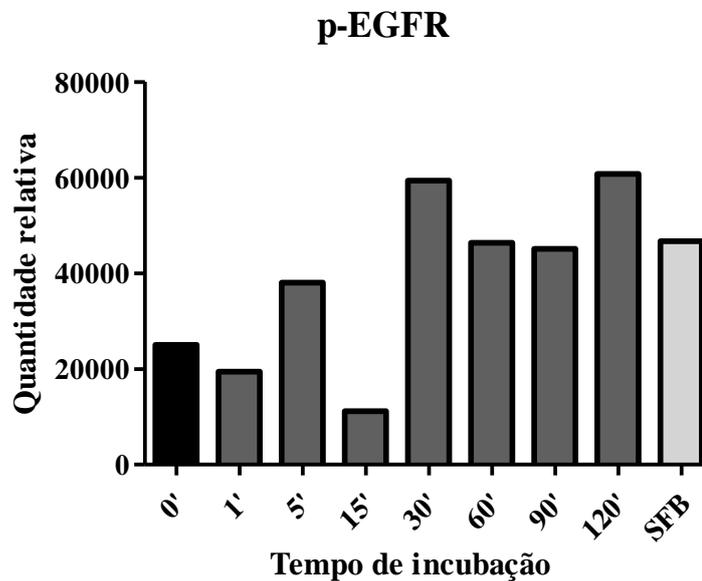
(B)



**Figura 20. Indução da fosforilação da proteína serina/treonina quinase Akt por formas AEs da cepa G de *T. cruzi*.** (A) Cinética de fosforilação da proteína Akt. Células Hela foram incubadas sem soro com AEs pelos tempos indicados (MOI 10:1). Tempo 0' corresponde ao controle (Ctl) sem interação com parasitos. Soro fetal bovino (SFB) corresponde à interação de células Hela com meio RPMI contendo 10% de SFB por 120 minutos. Lisados foram resolvidos em gel SDS-PAGE (30 µg proteína total) e analisados por Western Blot com anticorpo p-Akt (Thr308). A proteína β-actina foi utilizada como normalizadora. (B) Dados expressos como quantidade relativa a proteína constitutiva β-actina. Gráficos foram criados com o auxílio dos programas ImageJ® e Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Diferença estatisticamente significativa não foi constatada.

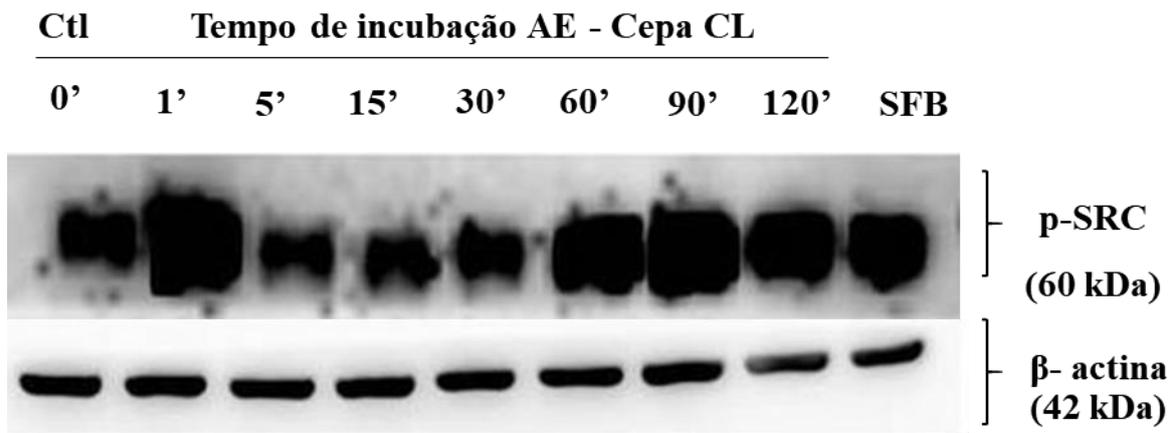


(B)

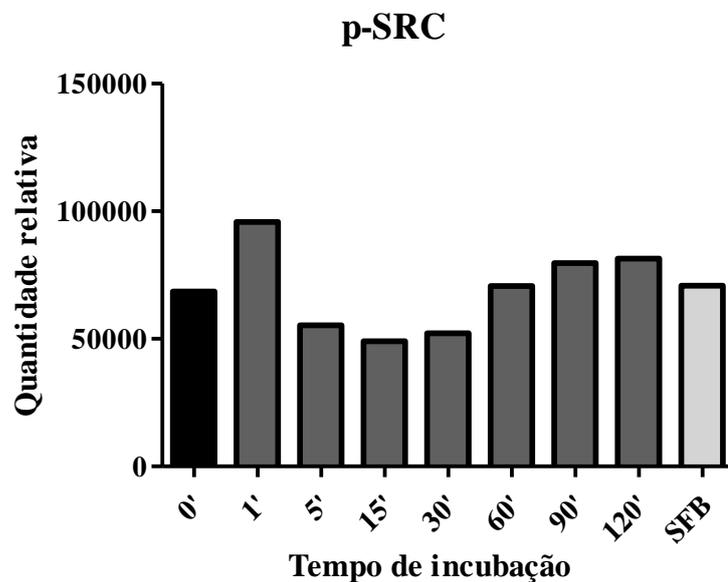


**Figura 21. Indução da fosforilação do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) por formas AEs da cepa G de *T. cruzi*.** (A) Cinética de fosforilação do receptor EGFR Células Hela foram incubadas sem soro com AEs pelos tempos indicados (MOI 10:1). Tempo 0' corresponde ao controle (Ctl) sem interação com parasitos. Soro fetal bovino (SFB) corresponde à interação de células Hela com meio RPMI contendo 10% de SFB por 120 minutos. Lisados foram resolvidos em gel SDS-PAGE (30 µg proteína total) e analisados por Western Blot com anticorpo e p-EGFR (Tyr1068). A proteína β-actina foi utilizada como normalizadora. (B) Dados expressos como quantidade relativa a proteína constitutiva β-actina Gráficos foram criados com o auxílio dos programas ImageJ® e Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Diferença estatisticamente significante não foi constatada.

(A)

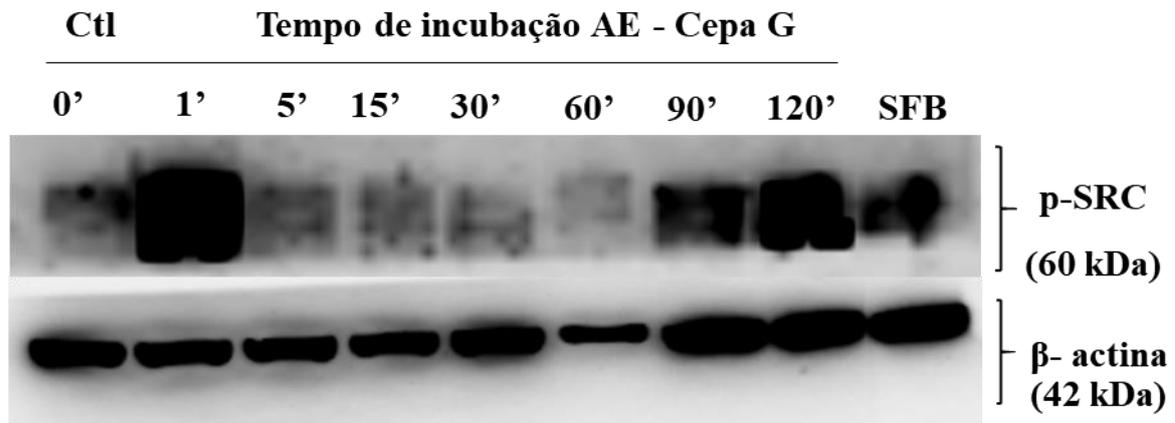


(B)

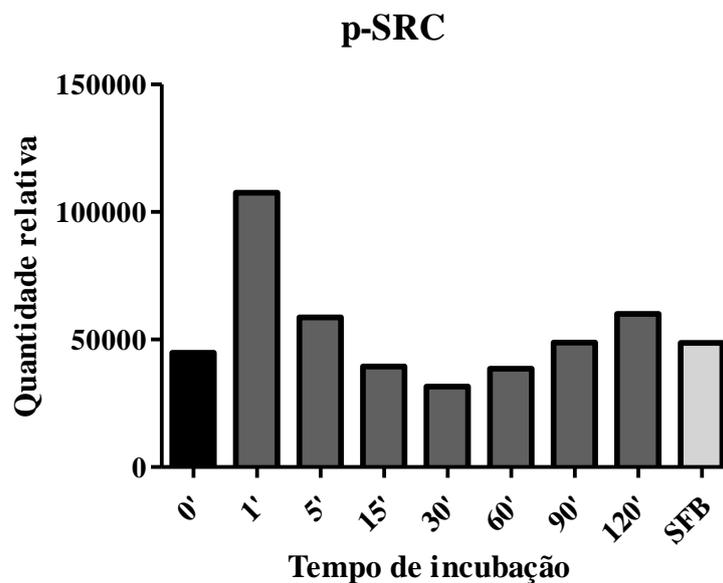


**Figura 22. Indução da fosforilação da proteína tirosina quinase SRC por formas AEs da cepa CL de *T. cruzi*.** (A) Cinética de fosforilação da proteína SRC. Células HeLa foram incubadas sem soro com AEs pelos tempos indicados (MOI 10:1). Tempo 0' corresponde ao controle (Ctl) sem interação com parasitos. Soro fetal bovino (SFB) corresponde à interação de células HeLa com meio RPMI contendo 10% de SFB por 120 minutos. Lisados foram resolvidos em gel SDS-PAGE (30  $\mu$ g proteína total) e analisados por Western Blot com anticorpo p-SRC (Tyr416). A proteína  $\beta$ -actina foi utilizada como normalizadora. (B) Dados expressos como quantidade relativa a proteína constitutiva  $\beta$ -actina. Gráficos foram criados com o auxílio dos programas ImageJ® e Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Diferença estatisticamente significativa não foi constatada.

(A)



(B)

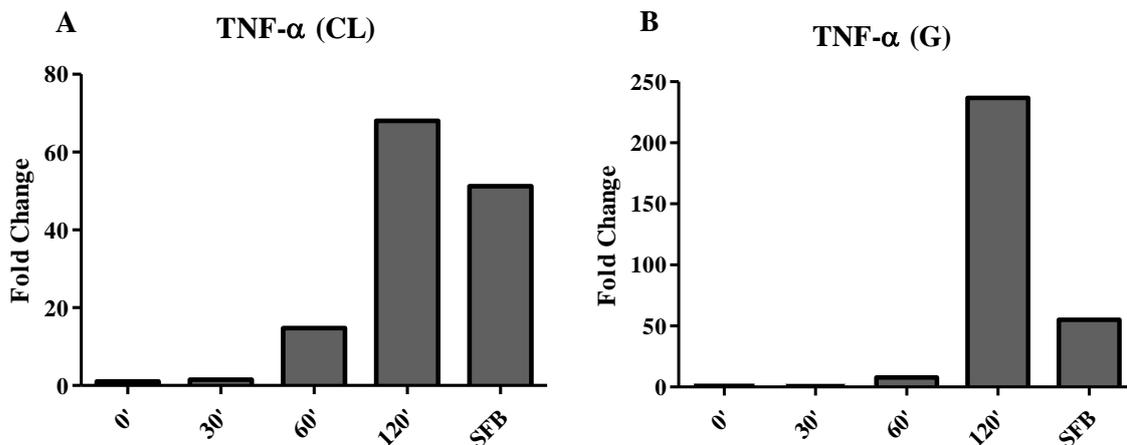


**Figura 23. Indução da fosforilação da proteína tirosina quinase SRC por formas AEs da cepa G de *T. cruzi*.** (A) Cinética de fosforilação da proteína SRC. Células Hela foram incubadas sem soro com AEs pelos tempos indicados (MOI 10:1). Tempo 0' corresponde ao controle (Ctl) sem interação com parasitos. Soro fetal bovino (SFB) corresponde à interação de células Hela com meio RPMI contendo 10% de SFB por 120. Lisados foram resolvidos em gel SDS-PAGE (30 µg proteína total) e analisados por Western Blot com anticorpo p-SRC (Tyr416). A proteína β-actina foi utilizada como normalizadora. (B) Dados expressos como quantidade relativa a proteína constitutiva β-actina. Gráficos foram criados com o auxílio dos programas ImageJ® e Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Diferença estatisticamente significativa não foi constatada.

#### 4.4. PCR em tempo real (RT-PCR)

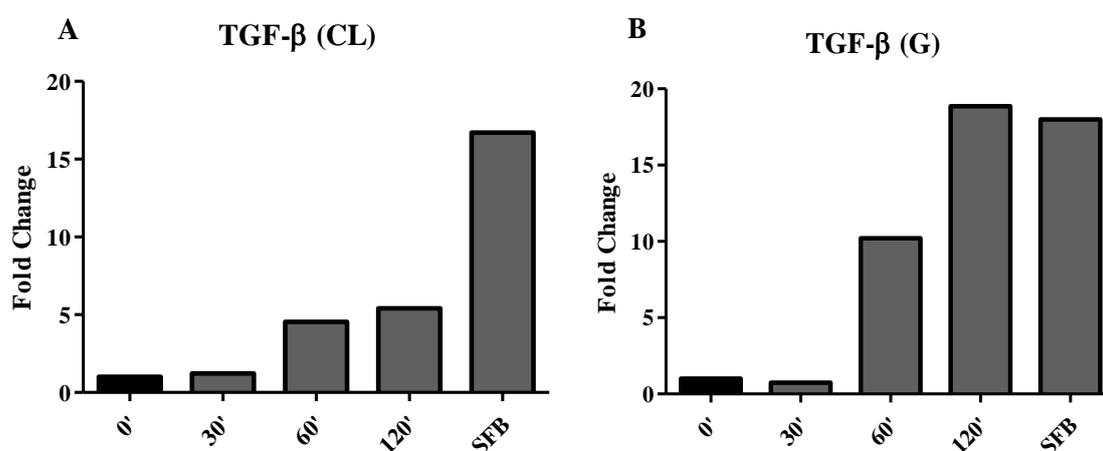
Após os testes dos iniciadores e escolha dos genes constitutivos que melhor respondessem às amostras, foram realizados os experimentos de qPCR para a quantificação da expressão de citocinas e fatores de transcrição. Os dados são expressos como “fold change” do controle, ou seja, representa a relação de quantas vezes aquele alvo está positivamente ou negativamente regulado em relação ao controle (0’).

A citocina TNF- $\alpha$  demonstrou ser expressa mediante o contato com parasitos de ambas as cepas a partir da primeira hora de infecção, como observados na figura 24. Aos 60 minutos (60’) de interação, AEs induziram o aumento da produção dessa citocina aos 60’ em cerca de 15 e 8 vezes, da cepa CL e G, respectivamente. Porém, aos 120 minutos (120’), enquanto AEs induziram a expressão dessa citocina em 70 vezes, o contato com AEs da cepa G demonstrou uma expressão muito mais elevada, 235 vezes maior que o controle. O SFB eleva a produção dessa citocina cerca de 50 vezes.



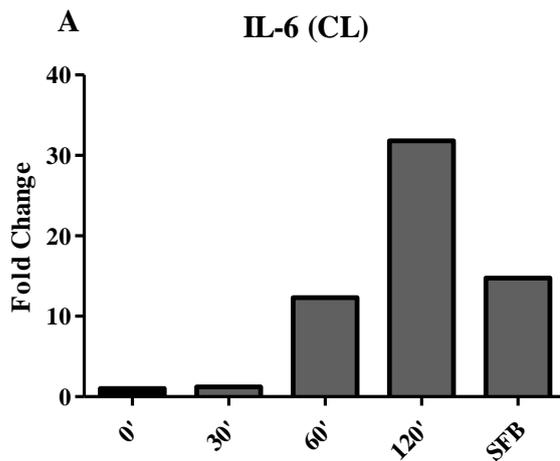
**Figura 24. Análise da expressão de TNF- $\alpha$  induzida por formas AEs das cepas CL e G de *T. cruzi*.** Células Hela foram incubadas sem soro com AEs pelos tempos indicados (MOI 10:1). Tempo 0' corresponde ao controle (Ctl) sem interação com parasitos. Soro fetal bovino (SFB) corresponde à interação de células Hela com meio RPMI contendo 10% de SFB por 120 %. O cDNA sintetizado (20 ng cDNA total) foi amplificado por técnica de RT-PCR usando os oligonucleotídeos específicos. Os genes constitutivos GAPDH e  $\beta$ -2-microglobulina foram utilizados como normalizadora. (A) Indução da expressão de TNF- $\alpha$  por formas AEs da cepa CL. (B) Indução da expressão de TNF- $\alpha$  por formas AEs da cepa G. Dados expressos como *fold change* do controle (0'). Gráficos foram confeccionados com o auxílio dos programas ImageJ® e Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Diferença estatisticamente significativa não foi constatada.

A produção da citocina TGF- $\beta$  também foi constatada a partir dos 60 minutos de interação de AEs com células Hela. A cepa CL mostrou uma expressão cerca de apenas 5 vezes maior aos 60 minutos (60') e 120 minutos (120'), enquanto a cepa G apresentou aumento na expressão cerca de 10 e 18 vezes maior para esses tempos respectivamente, ambas em comparação ao controle (Figura 25). O SFB induz a expressão dessa citocina semelhantemente a expressão induzida por AEs da cepa G aos 120 minutos (120').

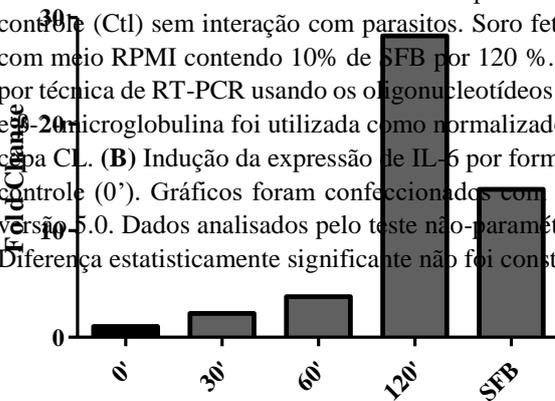


**Figura 25. Análise da expressão de TGF- $\beta$  induzida por formas AEs das cepas CL e G de *T. cruzi*.** Células Hela foram incubadas sem soro com AEs pelos tempos indicados (MOI 10:1). Tempo 0' corresponde ao controle (Ctl) sem interação com parasitos. Soro fetal bovino (SFB) corresponde à interação de células Hela com meio RPMI contendo 10% de SFB por 120 %. O cDNA sintetizado (20 ng cDNA total) foi amplificado por técnica de RT-PCR usando os oligonucleotídeos específicos. A expressão dos genes constitutivos GAPDH e  $\beta$ -2-microglobulina foi utilizada como normalizadora. (A) Indução da expressão de TGF- $\beta$  por formas AEs da cepa CL. (B) Indução da expressão de TGF- $\beta$  por formas AEs da cepa G. Dados expressos como *fold change* do controle (0'). Gráficos foram confeccionados com o auxílio dos programas ImageJ® e Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Diferença estatisticamente significativa não foi constatada.

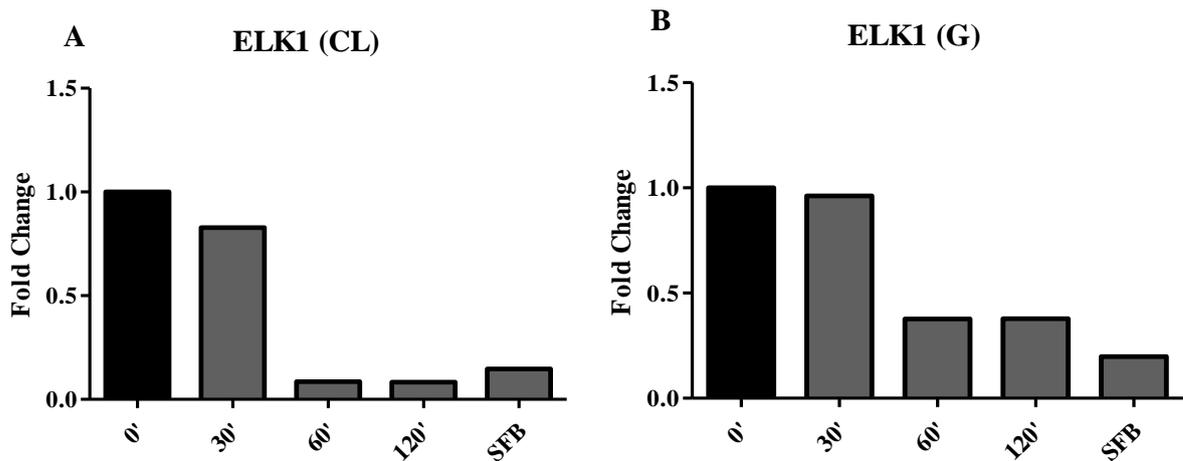
A expressão de IL-6 foi induzida durante o contato com ambas cepas. Observa-se um aumento da expressão de 12 e 4 vezes aos 60 minutos (60') e de 32 e 28 vezes aos 120 minutos (120') de contato com AEs das cepas CL e G, respectivamente (Figura 26).



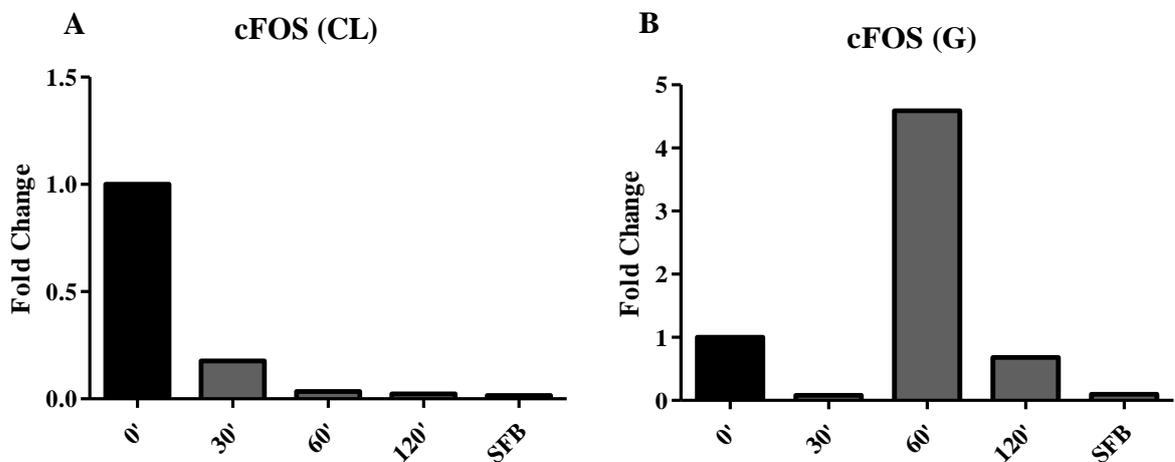
**Figura 26. Análise da expressão de IL-6 induzida por formas AEs das cepas CL e G de *T. cruzi*.** Células Hela foram incubadas sem soro com AEs pelos tempos indicados (MOI 10:1). Tempo 0' corresponde ao controle (Ctl) sem interação com parasitos. Soro fetal bovino (SFB) corresponde à interação de células Hela com meio RPMI contendo 10% de SFB por 120%. O cDNA sintetizado (20 ng cDNA total) foi amplificado por técnica de RT-PCR usando os oligonucleotídeos específicos. A expressão dos genes constitutivos GAPDH e  $\beta$ -2-microglobulina foi utilizada como normalizadora. **(A)** Indução da expressão de IL-6 por formas AEs da cepa CL. **(B)** Indução da expressão de IL-6 por formas AEs da cepa G. Dados expressos como *fold change* do controle (0'). Gráficos foram confeccionados com o auxílio dos programas ImageJ® e Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Diferença estatisticamente significante não foi constatada.



O fator de transcrição c-fos, quando expresso, atua sozinho ou forma um complexo com c-jun, denominado AP-1, que age como um complexo ativador transcricional. A expressão desse fator não foi observada durante o contato de AEs da cepa CL. Já AEs da cepa G foram capazes de induzir a expressão de c-fos aos 60 minutos de infecção, aproximadamente 5 vezes, quando comparada ao controle. Porém, a expressão desse fator parece ser importante apenas durante a primeira hora inicial, uma vez que na segunda hora de infecção (120') há uma regulação negativa para essa proteína. O SFB não induziu expressão desse fator (Figura 28).



**Figura 27. Análise da expressão de ELK1 induzida por formas AEs das cepas CL e G de *T. cruzi*.** Células Hela foram incubadas sem soro com AEs pelos tempos indicados (MOI 10:1). Tempo 0' corresponde ao controle (Ctl) sem interação com parasitos. Soro fetal bovino (SFB) corresponde a interação de células Hela com meio RPMI contendo 10% de SFB por 120 %. O cDNA sintetizado (20 ng cDNA total) foi amplificado por técnica de RT-PCR usando os oligonucleotídeos específicos. A expressão dos genes constitutivos GAPDH e  $\beta$ -2-microglobulina foi utilizada como normalizadora. (A) Indução da expressão de ELK1 por formas AEs da cepa CL. (B) Indução da expressão de ELK1 por formas AEs da cepa G. Dados expressos como *fold change* do controle (0'). Gráficos foram confeccionados com o auxílio dos softwares ImageJ® e Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Diferença estatisticamente significativa não foi constatada.



**Figura 28. Análise da expressão de cFOS induzida por formas AEs das cepas CL e G de *T. cruzi*.** Células Hela foram incubadas sem soro com AEs pelos tempos indicados (MOI 10:1). Tempo 0' corresponde ao controle (Ctl) sem interação com parasitos. Soro fetal bovino (SFB) corresponde a interação de células Hela com meio RPMI contendo 10% de SFB por 120 %. O cDNA sintetizado (20 ng cDNA total) foi amplificado por técnica de RT-PCR usando os oligonucleotídeos específicos. A expressão dos genes constitutivos GAPDH e  $\beta$ -2-microglobulina foi utilizada como normalizadora. (A) Indução da expressão de cFOS por formas AEs da cepa CL. (B) Indução da expressão de cFOS por formas AEs da cepa G. Dados expressos como *fold change* do controle (0'). Gráficos foram confeccionados com o auxílio dos programas ImageJ® e Graphpad Prism®, versão 5.0. Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Diferença estatisticamente significativa não foi constatada.

## 5. Discussão

A ativação da cascata canônica de sinalização mediada por MAPK, através da transdução de sinais externos, é fundamental para manutenção da homeostase celular e modulação da resposta imune induzida por patógenos (revisado por SOARES-SILVA *et al.*, 2016). Proteínas quinases pertencentes a essa família controlam diversos processos celulares como expressão gênica, resposta à estresse, apoptose, proliferação e diferenciação (CARGNELLO; ROUX, 2011; RAMAN; CHEN; COBB, 2007).

O processo de invasão celular de *T. cruzi* é complexo e multifatorial e depende da expressão e/ou ativação de diferentes proteínas do parasito e do hospedeiro (revisado por BONFIM-MELO *et al.*, 2015). *T. cruzi*, um parasito celular obrigatório, é capaz de infectar células do sistema imune, como macrófagos, mas também, células não fagocitárias profissionais, como células epiteliais (FERNANDES *et al.*, 2013; MORTARA *et al.*, 1999), modelo selecionado para o presente estudo (Hela). O pré-requisito para a colonização dessas células é a habilidade de interagir como proteínas de superfície celular, desencadeando atividades celulares específicas (LEY; ANDREWS; ROBBINS, 1988).

O presente estudo é primeiro a sugerir a relação do perfil de ativação da via MAPK na internalização de formas amastigotas extracelulares (AEs). Essas formas de *T. cruzi* são geradas a partir da eclosão precoce de células previamente infectadas com esse parasito ou por diferenciação de formas tripomastigotas sanguíneas (TS) circulantes. Já foi demonstrado *in vitro* que essas formas divergem em capacidade infectiva, sendo AEs da cepa G mais infectivos que da cepa CL, e que sua internalização é dependente do remodelamento do esqueleto de actina celular (FERNANDES *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2012; MORTARA *et al.*, 1999; PROCOPIO *et al.*, 1998).

Ensaio de invasão foram realizados utilizando diferentes inibidores objetivando bloquear a ação de quinases pertencentes à via MAPK e o receptor de crescimento epidermal (EGFR), e observar os efeitos *in vitro* dessas proteínas na internalização de AEs em células HeLa. A via MAPK parece não possuir efeito significativo na internalização de formas AEs da cepa CL, uma vez que a inibição dessas quinases não alterou o número de parasitos intracelulares. No entanto, foi observada a redução estatisticamente significativa no número de parasitos internalizados da cepa G quando a MAPK p38 (Figura 7B) foi inibida. Esse dado indica que essa proteína quinase parece ser fundamental para a entrada do parasito na célula dessa cepa em particular. Ainda, a inibição de ERK1/2 (Figura 8B) e o receptor tirosina quinase

EGFR (Figura 10B) mostraram uma tendência na redução na infecção. Apesar de uma possível relação dessas proteínas no processo de invasão de AEs, faz-se necessária a confirmação desses dados previamente citados. A relevância de ERK1/2 na invasão de *T. cruzi* já havia sido previamente demonstrada por Magdesian e colaboradores (2007) que avaliaram a relação do domínio FLY, conservado dentro da superfamília de proteínas transialidades Gp85 presentes na superfície de formas tripomastigotas, durante o processo de invasão de *T. cruzi* em fibroblastos. Esse domínio encontrado em proteínas transialidades é importante durante o processo de adesão e entrada desses parasitos em células epiteliais. Os autores desse estudo citado demonstraram que tripomastigotas induzem a ativação da MAPK ERK como forma de favorecimento da internalização durante o processo infectivo e que essa quinase, uma vez inibida, bloqueia a adesão de FLY na célula e inibe a invasão desses parasitos (MAGDESIAN *et al.*, 2007). Já o estímulo de EGFR é um dos principais desencadeadores da cascata de fosforilação que resulta na ativação de ERK1/2 (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010). Esse receptor parece ser necessário para a entrada de parasitos da cepa G em células Hela (Figura 10B) uma vez que quando inibido apresenta tendência na redução de parasitos internalizados.

A ativação de algumas proteínas pertencentes à MAPK por tripomastigotas já foi proposta em células endoteliais, cardíacas e do sistema nervoso (MUKHERJEE *et al.*, 2004; CHUENKOVA; PEREIRA, 2001). MAPK vêm sendo amplamente estudadas no contexto de regulação de respostas imunes e está relacionada tanto à resposta imune inata quanto adaptativa mediante a interação com patógenos (CHAKRABORTY *et al.*, 2015; MOYES *et al.*, 2010; RUB *et al.*, 2009).

Células epiteliais foram ignoradas como componentes do sistema imune até a última década, porém uma mudança desse padrão vem sendo observada com surgimento de diversos estudos mostrando a relevância dessas células como primeira barreira de interação com patógenos e de propagação de sinais que coordenam a resposta imune inata e adaptativa (BUI-MARINOS; KATZENBACK, 2019; PATEL *et al.*, 2018; VARGA; LU *et al.*, 2017;). Experimentos *in vitro* não só são necessários para o entendimento de diversos processos fisiológicos, químicos e biológicos, mas também cruciais para o direcionamento de estudos de fenótipos *in vivo*.

No presente estudo, demonstramos uma divergência no perfil de fosforilação, da via MAPK e de proteínas que comunicam com a via, induzido por AEs de *T. cruzi* entre as duas

cepas alvo: G e CL. As vias de ERK1/2, MEK1/2 e EGFR foram ativadas de forma distinta por AEs das duas cepas.

Moyes e colaboradores demonstraram esse efeito de resposta em *Candida albicans* que é capaz de induzir ativação bifásica de ERK1/2 em células epiteliais como forma de primeiro alerta ao sistema imunológico da mudança de uma forma comensal (fungo) para sua forma patogênica (hifa). De acordo com esse autor, a ativação de uma resposta bifásica é importante para permitir que células epiteliais mantenha-se quiescentes mediante baixos níveis de infecção, mas também pode indicar um mecanismo crucial de alerta ao sistema imune mediado pelo hospedeiro como forma de identificação de um possível perigo e defesa contra patógenos oportunistas, através do acionamento de uma resposta imune mediada pela produção de interleucinas e citocinas inflamatórias (MOYES *et al.*, 2010).

O perfil de fosforilação mediado por AEs da cepa G, formas mais infectivas, apresentou ativação de forma bifásica semelhante ao apresentado pelo autor previamente citado. Esse perfil pode estar associado à diferença de infectividade que AEs das duas cepas apresentam, sendo essa a cepa G mais infectiva para essas formas que CL. Ainda, essa forma de ativação da via MAPK parece também ser dependente da morfologia e característica de AEs, uma vez que já foi demonstrado por nosso grupo (dados não publicados), que formas metacíclicas da cepa G, que apresentam menor infectividade que AEs dessa mesma cepa, não induzem ativação bifásica.

Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que a inibição tanto de ERK e p38 quanto de JNK regula negativamente a ativação de MKP1, porém particularmente ERK1/2 levou à redução de ativação dessa proteína quinase, o que indica que ERK1/2 controla a fosforilação de MKP1 (MOYES *et al.*, 2010). No entanto, esses dados contrastam com o presente estudo, uma vez que a ativação por MKP1 parece não depender da ativação de ERK1/2 durante a interação com AEs de *T. cruzi*.

Bonfim-Melo e colaboradores demonstraram que o recrutamento das proteínas PKD1 e cortactina, cruciais durante o recrutamento de actina da célula e internalização de AEs de *T. cruzi* em células epiteliais, é ativado via ERK (BONFIM-MELO *et al.*, 2015). Apesar da diferença de infectividade que essas duas cepas avaliadas no presente estudo apresentam, o aumento observado na fosforilação de ERK1/2 durante a primeira hora, momento de internalização do parasito, sugere que essa via seja importante durante esse processo. No entanto, AEs de diferentes cepas ativam a mesma via de forma distinta.

Durante a infecção por *C. albicans* em células epiteliais o receptor de fator epidermal (EGFR) é ativado e capaz de desencadear a ativação de p38 e ERK e consequente expressão do gene COX-2, envolvido na indução da resposta imune pela catálise de prostaglandinas (WANG *et al.*, 2017). No entanto, no presente estudo, a ativação desse receptor parece ser condicionada à ativação de ERK1/2 apenas durante o contato com AEs da cepa G, já que demonstra um perfil de ativação semelhante a essa via. Foi demonstrado que AEs de *T. cruzi* sequestram moléculas EGF e utilizam essa proteína para transdução de sinal própria, ativando as suas próprias vias (GHANSAH *et al.*, 2002). Desta forma, é possível que durante o processo de invasão das formas AEs da cepa CL, o EGF seja sequestrado pelo parasito, modulando negativamente a ativação de EGFR porém, a ativação desse receptor para a cepa G parece ser interessante direcionamento da formação de uma resposta bifásica. Já a fosforilação de MEK1/2 para essa mesma cepa, apesar de uma diminuição na ativação da isoforma MEK1, apenas a isoforma MEK2 parece suprir o papel de ativação da via ERK1/2.

p38 regula a produção da citocina regulatória IL-12 (ARTHUR; LEY, 2013), responsável pelo recrutamento de células T CD4+ tipo Th1, cruciais na proteção contra patógenos intracelulares (MOSMANN; MOORE, 1991; ROMAGNANI, 2006). A fosforilação dessa proteína é induzida de forma bifásica por AEs da cepa CL e sua fosforilação parece não sofrer influência da fosfatase MKP1, como esperado. Esses dados divergem dos encontrados para *Leishmania major*, também um parasito intracelular obrigatório, que é capaz de modular positivamente a ativação de MKP1, com consequente impedimento da formação de uma resposta Th1, através da desativação de p38, favorecendo a manutenção do parasito intracelularmente (SRIVASTAVA; SUDAN; SAHA, 2011).

De acordo dados de encontrados por Murkherjee e colaboradores (2004), formas tripomastigotas de *T. cruzi* não induzem a via MAPK p38 em células endoteliais e em músculo liso. No entanto, esses autores consideraram tempos superiores aos analisados no presente estudo (24h, 48 e 72), o que poderia sugerir que a ativação da via de p38 é modulada negativamente nessas formas nos momentos de infecção tardia e ativadas no primeiro momento de contato do parasito com a célula (MUKHERJEE *et al.*, 2004).

NFκB que age como fator transcricional nuclear direcionando a produção de citocinas/interleucinas inflamatórias como TNF-α, IL-1, IL-12 e IL-6, IFN (NENNIG; SCHANK, 2017; OECKINGHAUS; BLANDER; SANDER, 2012; GHOSH, 2009; GILMORE, 2006). Ahmed e colaboradores (2006) mostraram em células resistentes à radiação

por meio de experimentos de co-localização de p65 e MEK que essas proteínas interagem, causando inibição da formação e translocação do complexo p65/ERK para o núcleo. Esse autor sugere que o efeito inibitório dessa proteína pode levar a um aumento de sobrevivência celular (AHMED *et al.*, 2006).

Considerando os achados do estudo previamente citado, talvez esse fato possa explicar o declínio de fosforilação da isoforma MEK1 após a primeira meia hora de contato com AEs da cepa CL e que se estende ao longo da infecção. Entretanto, isso não acontece na interação com AEs da cepa G, que talvez seja explicado pela forma de ativação bifásica induzida como uma estratégia do hospedeiro para indicar ao sistema imune a presença de um patógeno oportunista. Dessa forma, a avaliação da ativação e consequente localização desse complexo é fundamental para esclarecer a possível participação da via de NF $\kappa$ B na regulação da ativação da quinase MEK.

A proteína SRC apresentou ativação apenas no primeiro minuto de contato com parasitos de ambas cepas. A fosforilação de SRC é dependente da ativação por integrinas quando estas recebem algum estímulo extracelular (revisado por BERRIER e YAMADA, 2007), o que pode justificar a maior fosforilação da quinase no primeiro minuto de incubação. No entanto, o decaimento de SRC indica que talvez essa proteína não exerça um papel fundamental na ativação de ERK1/2 e que essa via possa, nesse contexto, ser ativada independentemente da ativação de SRC. Corroborando dados encontrados no presente trabalho, Bonfim-Melo e colaboradores (2015) encontraram que AEs da cepa G não induzem a fosforilação de SRC em células Hela, o que parece ocorrer também com AEs da cepa CL como aqui demonstrado (BONFIM-MELO *et al.*, 2015). Já formas tripomastigotas do clone Dm28 utilizam dessa proteína em favorecimento da sua internalização em células cardíacas, assim como mostram os dados de Melo e colaboradores (MELO *et al.*, 2014).

A serina/treonina quinase AKT está relacionada tanto a ativação do eixo PI3K–AKT–mTOR em resposta a nutrientes e fatores de crescimento, quanto do eixo PI3K-AKT-NF $\kappa$ B e outros caminhos de ativação (MARTELLI *et al.*, 2006). Essa proteína também é capaz de regular a ativação da via ERK1/2 através do controle da fosforilação e inativação de proteínas anteriores na cascata, como a MAP3K Raf que leva à ativação do eixo Raf-MEK-ERK1/2 (MENGES; MCCANCE, 2008). Chuenkoava e colaboradores mostraram que a ativação de PI3K-AKT induzidas por tripomastigotas em células nervosas (Schwann) parece ser dependente da quantidade de parasitos adicionados, ou seja, de forma dose-dependente e

também da ativação de proteínas transialidases, como fator neurotrófico derivado do parasito (CHUENKOVA; PERRIN, 2009; CHUENKOVA; PEREIRA, 2001). Dados de outro estudo também demonstram que essas formas são capazes de induzir a fosforilação de AKT e que a inibição dessa via é capaz de reduzir a carga parasitária de *T. cruzi* tanto em células fagocíticas profissionais (macrófagos murinos e humanos) quanto não profissionais (Vero e fibroblastos) (WILKOWSKY *et al.*, 2001). Esses dados divergem dos encontrados no presente estudo, uma vez que essa proteína foi ativada apenas em níveis basais durante a interação com AEs, indicando que a mesma parece não sofrer aumento de fosforilação durante a invasão dessas formas, diferentemente do encontrado para formas tripomastigotas.

A produção IL-6 e TNF- $\alpha$ , envolvidas no desencadeamento do processo inflamatório, parece ser necessária apenas após o período de uma hora em que o parasito está internalizado, sendo que AEs da cepa G são capazes de induzir a produção de TNF- $\alpha$  muito mais intensamente que da cepa CL. Ainda, a produção de TGF- $\beta$  também é mais intensa em células submetidas a interação com a cepa G, indicando uma possível tentativa de controle da exacerbação da resposta imune.

ELK1 não foi induzido em ambas cepas, esse fator de transcrição também não foi expresso em macrófagos murinos na infecção por *L. donovani*, parasito da mesma família de *T. cruzi* (NANDAN; LO; REINER, 1999). Já *C. albicans* induz a produção de ELK1 na primeira meia hora de infecção e tardiamente, aos 120 minutos (MOYES *et al.*, 2010). Maurice e colaboradores (2018) mostraram que em animais *knockout* para ELK1 e ELK4 há uma maior ativação de células T CD8+*-like* e, também, uma redução da fosforilação de ERK, indicando um possível controle da via ERK sobre a geração dessas células (MAURICE *et al.*, 2018).

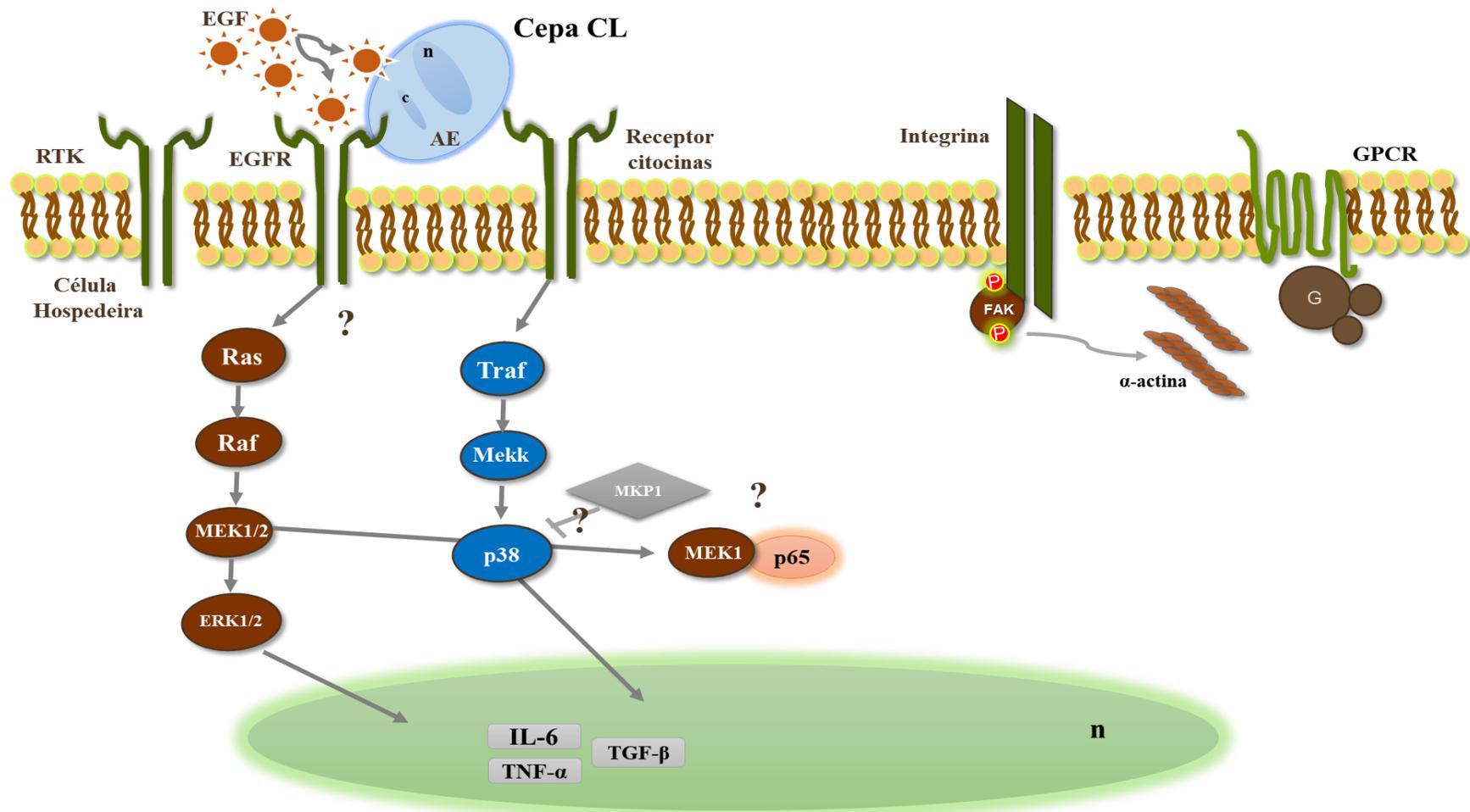
Moyes e colaboradores mostraram que a expressão de cFOS por células epiteliais é dependente da formação de hifas de *C. albicans* e não era induzida pela forma comensal desse microrganismo (fungo); por outra parte, a expressão de cJUN não é dependente desse fator. Ainda, esse estudo demonstrou a formação de uma resposta imune inflamatória mediada pela produção de IL-6 e IL-8 independente da ativação do fator de transcrição cFOS (MOYES *et al.*, 2010). Posteriormente, esse mesmo grupo demonstrou que a produção de IL-6 parece ser induzida em consequência da multiplicação e patogenicidade de *C. albicans* e *C. dubliniensis* (MOYES *et al.*, 2012). Nandan, Lo e Reiner (1999) correlacionam a atenuação de cFOS ao decaimento da fosforilação de ERK1/2 em macrófagos murinos infectados por *L. donovani*.

A modulação da resposta imune por patógenos é uma importante estratégia de defesa e manutenção da infecção celular. Dessa forma, o entendimento da relação entre patógenos e hospedeiros faz-se necessária no controle de diversas doenças, principalmente em organismos polimórficos e de alta complexidade como *Trypanosoma cruzi*.

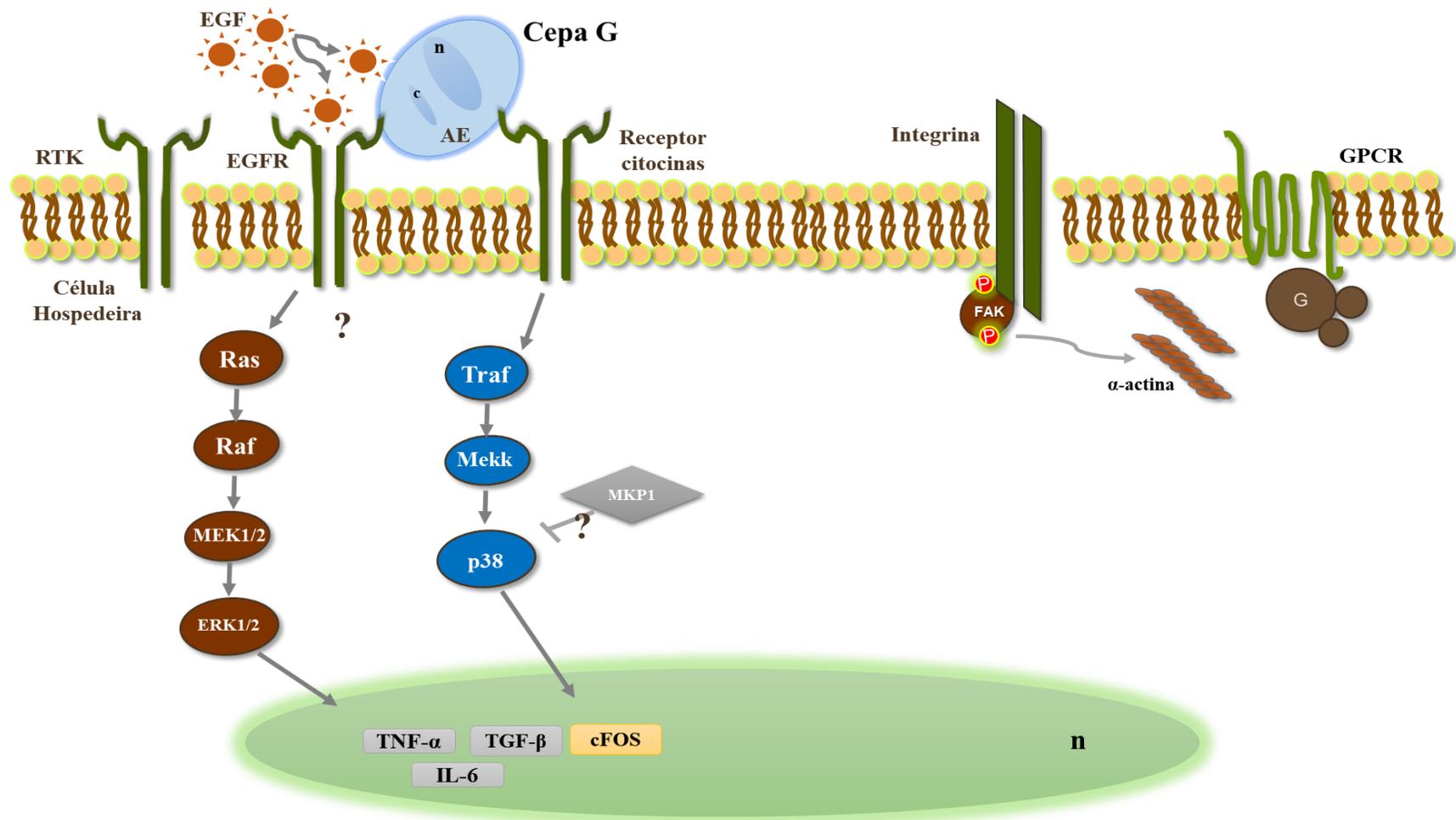
No atual estudo, avaliamos a relação de duas cepas de diferentes infectividades desse parasito e verificamos que elas apresentam perfis distintos de indução de ativação da via MAPK e sua consequente ativação da resposta imune. Os resultados obtidos sugerem participação de diversas proteínas quinases, fatores de transcrição e citocinas/interleucinas, e são sintetizados nos tópicos a seguir:

- ❖ A via MEK-ERK mostrou uma relação na internalização e sobrevivência de AEs de *T. cruzi*; uma ativação bifásica, durante a interação com AEs da cepa G, possivelmente é dependente da maior infectividade apresentada por essa cepa;
- ❖ É possível que o receptor de EGF (EGFR) seja ativado em processos iniciais de invasão celular, nos momentos de adesão, e logo após seja desativado; fato possivelmente explicado pelo sequestro de EGF pelo parasito (cepa CL); esse receptor pode estar relacionado também ao direcionamento de uma resposta bifásica da via ERK1/2 (cepa G);
- ❖ p38 parece também ser importante na internalização de AEs da cepa G;
- ❖ A fosfatase MKP1 parece não ser regulada por ERK1/2, diferentemente do que acontece na interação de células epiteliais com formas patogênicas de *C. albicans*.
- ❖ AEs da cepa CL induziram a expressão de IL-6, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ;
- ❖ As interleucinas/citocinas IL-6, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  foram produzidas em células HeLa mediante a interação com AEs da cepa G, sendo as duas últimas citadas induzidas com maior intensidade para essa cepa quando comparada à cepa CL;
- ❖ Foi visto, ainda, que AEs não induziram a ativação de quinases de vias próximas, Akt e SRC.

Considerando os resultados encontradas no presente estudo, dois esquemas distintos de ativação da cascata de sinalização de MAPK por AEs da cepa CL e G na invasão de células Hela foi proposto e pode ser observado nas Figura 29 e 30.



**Figura 29.** Modelo de sinalização proposto durante a invasão por formas amastigotas extracelulares (AEs) da cepa CL. n. núcleo; c. cinetoplasto; AE. amastigota extracelular; EGF. Fator de crescimento epidermal; EGFR. receptor de fator de crescimento epidermal; RTK. receptor tirosina quinase; GPCR. receptor acoplado a proteína G; Ras. RAT Sarcoma vírus; Raf. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*; MEK1/2. MAP (Proteína ativada por mitógenos)/ERK (Quinase regulada por estímulos extracelulares) quinase 1 e 2; ERK1/2. Quinase regulada por estímulos extracelulares 1 e 2; Traf. Proteína associada ao fator de necrose tumoral Tumor; MeKK. MAP 3 quinase; p38. p38 proteína ativada por mitógenos; MKP1. MAPK fosfatase 1; p65. NFκB fator nuclear kappa B subunidade p65; FAK. Quinase de adesão focal.



**Figura 30.** Modelo de sinaliza o proposto durante a invasão por formas amastigotas extracelulares (AEs) da cepa G. n. núcleo; c. cinetoplasto; AE. amastigota extracelular; EGF. Fator de crescimento epidermal; EGFR. receptor de fator de crescimento epidermal; RTK. receptor tirosina quinase; GPCR. receptor acoplado a proteína G; Ras. RAt Sarcoma vírus; Raf. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*; MEK1/2. MAP (Proteína ativada por mitógenos)/ERK (Quinase regulada por estímulos extracelulares) quinase 1 e 2; ERK1/2. Quinase regulada por estímulos extracelulares 1 e 2; Traf. Proteína associada ao fator de necrose tumoral Tumor; Mekk. MAP 3 quinase; p38. p38 proteína ativada por mitógenos; MKP1. MAPK fosfatase 1; FAK. Quinase de adesão focal.

## 6. Perspectivas

A partir do que foi observado, é preciso investigar e esclarecer diversos aspectos relacionados a interação de AEs com células Hela, assim como descritos:

- ❖ A participação das vias ERK1/2, p38 e do receptor de fator epidermal durante o processo de internalização de AEs por meio de novos experimentos de invasão;
- ❖ Avaliar a participação da proteína Akt e Src na invasão por AEs;
- ❖ A ativação de ERK1/2, possivelmente mediada por outro receptor diferente de EGFR;
- ❖ Avaliar a localização de NFκB e, principalmente, da proteína p65 e sua possível interação com MAPK durante a infecção por AEs;
- ❖ Avaliar a modulação da expressão de IL-12 por AEs da cepa CL;
- ❖ Avaliar a ativação da fosfatase MKP3, que age sobre a via de ERK1/2;
- ❖ Analisar a cinética de fosforilação de JNK, uma vez que esta via responde a vários tipos de estresse celular.

## 7. Conclusão

De acordo com o visto no presente estudo, as vias MAPK p38 e ERK1/2 são induzidas mediante o contato com formas amastigotas extracelulares (AEs) das cepas G e CL de forma diferencial e a cinética de ativação de forma bifásica pode estar relacionada à maior infectividade e ao desenvolvimento da resposta imune através da produção de citocinas/interleucinas. Ainda, esse estudo trouxe o questionamento sobre a participação do receptor de EGF na transdução do sinal pela via MAPK da célula hospedeira, uma vez que esse é pouco ativado ou expresso em níveis basais em grande parte do processo de invasão (cepa CL), o que sugere uma ativação da via MAPK por outro mediador. No entanto, a ativação desse receptor pode também estar também relacionada ao direcionamento da formação de uma resposta bifásica (cepa G). A compreensão inicial de como essa via é ativada por patógenos é uma importante forma de abrir possibilidades para futuros estudos, principalmente visando relacionar essa via a diferentes morfologias de *Trypanosoma cruzi* de cepas com maior importância clínica em humanos.

## 8. Referências

- AHMED, K.M.; S. DONG; M. FAN; J. J. LI. Nuclear Factor- $\kappa$ B p65 Inhibits Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway in Radioresistant Breast Cancer Cells. *Molecular Cancer Research*, v. 4, n. 12, p. 945–955, 2006.
- ALDASORO, E.; POSADA, E.; REQUENA-MÉNDEZ, A.; CALVO-CANO, A.; SERRET, N.; CASELLAS, A.; SANZ, S.; SOY, D.; PINAZO, M.J; GASCON, J. What to expect and when: Benznidazole toxicity in chronic Chagas' disease treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 73, n. 4, p. 1060–1067, 2018.
- ANDREWS, N.W.; HONG, K.S.; ROBBINS, E.S.; NUSSENZWEIG, V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental parasitology*, v. 64, p. 474-484, 1987.
- ASHIDA, H.; NAKANO, H.; SASAKAWA, C. *Shigella* IpaH0722 E3 Ubiquitin Ligase Effector Targets TRAF2 to Inhibit PKC–NF- $\kappa$ B Activity in Invaded Epithelial Cells. *PLoS Pathogens*, v. 9, n. 6, p. e1003409, 2013.
- BAHIA, D. A New Trick for a Conserved Enzyme: Mevalonate Kinase, a Glycosomal Enzyme, Can Be Secreted by *Trypanosoma cruzi* and Modulate Cell Invasion and Signaling. Is It Another Moonlighting Enzyme? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, p. 426, 2017.
- BALARAMAN, S.; SINGH, V. K.; TEWARY, P.; MADHUBALA, R. *Leishmania* lipophosphoglycan activates the transcription factor activating protein 1 in J774A.1 macrophages through the extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein kinase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 139, n. 1, p. 117–127, jan. 2005.
- BARDWELL, L. Mechanisms of MAPK signalling specificity. *Biochemical Society Transactions*, v. 34, n. 5, p. 837–841, 2006.
- BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World Journal of Experimental Medicine*, v. 3, n. 1, p. 1, 2013.
- BEN-OTHTMAN, R.; DELLAGI, K.; GUIZANI-TABBANE, L. *Leishmania major* parasites induced macrophage tolerance: Implication of MAPK and NF- $\kappa$ B pathways. *Molecular Immunology*, v. 46, n. 16, p. 3438–3444, 2009.
- BERN, C. Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.

- BLANDER, J.M; SANDER, L.E. Beyond pattern recognition: Five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, n. 3, p. 215–225, 2012.
- BONFIM-MELO, A.; ZANETTI, B.F.; FERREIRA, E.R.; VANDONINCK, S.; SANG, W.H.; LINT, J.V.; MORTARA, R.A.; BAHIA, D. *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes trigger the protein kinase D1-cortactin-actin pathway during cell invasion. *Cellular Microbiology*, v. 17, n. 12, p. 1797–1810, 2015.
- BORISH, L.C.; STEINKE, J.W. Cytokines and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 111, n. 2, p. S460–S475, 2003.
- BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 59, n. 1, p. 19–26, 17 mar. 1965.
- BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. *Scielo Books*, p. 24–633 31, 1997.
- BYEON, H.K.; KU, M.; YANG, J. Beyond EGFR inhibition: multilateral combat strategies to stop the progression of head and neck cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 51, n. 8, 2019.
- CARGNELLO, M.; ROUX, P.P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 75, n. 1, p. 50–83, 2011.
- CAENEPEEL, S.; CHARYDCZAK, G.; SUDARSANAM, S.; HUNTER, T.; MANNING, G. The mouse kinome: Discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 101, n. 32, p. 11707–11712, 2004.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1909.
- CHANG, F.; STEELMAN, L.S.; LEE, J.T.; SHELTON, J.G.; NAVOLANIC, P.M.; BLALOCK, W.L.; FRANKLIN, R.A.; MCCUBREY, J.A. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia*, v. 17, p. 1263–1293, 2013.
- CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, v. 410, n. 6824, p. 37–40, 2001.

CHUENKOVA, M.V.; PEREIRA, M.A. The *T. cruzi* trans-sialidase induces PC12 cell differentiation via MAPK/ERK pathway. *NeuroReport*, v. 12, n. 17, p. 3715–3718, 2001.

CHUENKOVA, M.V.; FURNARI, F.B.; W.K., CAVENEE; PEREIRA, M. *Trypanosoma cruzi* targets Akt in host cells as an intracellular antiapoptotic strategy. *Science signaling*, v. 98, n. 17, p. 9936–9941, 2009.

CLAYTON, J. Chagas disease. *Nature*, v. 465, p. 4, 2010.

COHEN, P. Protein kinases - the major drug target of twenty century. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 1, p. 309-315, 2002.

CRUZ, M.C.; SOUZA-MELO, N.; DA SILVA, C.V.; DAROCHA, W.D.; BAHIA, D.; ARAÚJO, P.R.; TEIXEIRA, S.R.; MORTARA, R.A. *Trypanosoma cruzi*: Role of  $\delta$ -Amastin on Extracellular Amastigote Cell Invasion and Differentiation. *PLoS ONE*, v. 7, n. 12, 2012.

DA SILVA, C.V.; KAWASHITA, S.Y.; PROBST, C.M.; DALLAGIOVANNA, B.; CRUZ, M.C.; SILVA, E.A.; SOUTO-PADRÓN, KRIEGER, T. C.B.S.; GOLDENBERG, M.A.; BRIONES, S.; ANDREWS, N. W. MORTARA, R.A. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. *Microbes and Infection*, v. 11, n. 5, p. 563–570, 2009.

DAS, V.; KALYAN, G.; HAZRA, S.; PALI, M. Understanding the role of structural integrity and differential expression of integrin profiling to identify potential therapeutic targets in breast cancer. *Journal of Cellular Physiology*, v. 233, n. 1, p. 168–185, 2018.

DIAS, J.C.P.; RAMOS, J.A.N.; GONTIJO, E.D.; OSTERMAYER, A.L.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; COURA, J.R.; TORRES, R.M.; MELO, J.R.C.; ALMEIDA, E.A.; OLIVEIRA, J.W.; SILVEIRA, A.C; REZENDE, J.M.; PINTO, F.S.; FERREIRA, A.W.; RASSI, A.; FRAGATA FILHO, A.A.; SOUSA, A.S.; FILHO, D.C.; JANSEN, A.M.; ANDRADE, G.M.Q.; BRITTO, C.; PINTO, A.Y.N.; RASSI, J.A.; CAMPOS, D.E.; ABAD-FRANCH, F.; SANTOS, S.E.; CHIARI, E.; HASSLOCHER-MORENO, A.M.; MOREIRA, E.F.; MARQUES, D.S.O.; SILVA, E.L.; MARINNETO, J.A.; GALVÃO, L.M.C.; XAVIER, S.S.; VALENTE, S.A.S.; CARVALHO, N.B.; CARDOSO, A.V.; COSTA, V.M.; VIVALDINI, S.M.; OLIVEIRA, S.M.; VALENTE, V.C.; LIMA, M.M.; ALVES, R.V. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, n. 21, p. 1–10, 2016.

OLIVEIRA, C.M.B.; R. K. S. TSA; ISSY, A. M.; GEROLA, L.R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 61, n. 2, p. 255–265, 2011.

- EBERL, G. Immunity by equilibrium. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 8, p. 524–532, 2016.
- FERGUSON, F.M.; GRAY, N.S. Kinase inhibitors: The road ahead. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 17, n. 5, p. 353–376, 2018.
- FERNANDES, M.C.; FLANNERY, A.R.; ANDREWS, N.; MORTARA, R. A. Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. *Cellular Microbiology*, v. 15, n. 6, p. 977–991, 2013.
- FERREIRA, E.R.; BONFIM-MELO, A.; MORTARA, R.A.; BAHIA, D. *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes and host cell signaling: More pieces to the puzzle. *Frontiers in Immunology*, v. 3, n.9, p. 1–6, 2012.
- FERREIRA, E.R.; HORJALES, E.; BONFIM-MELO, A., CORTEZ, C.; DA SILVA, C.V. GROOTE, M.; SOBREIRA, T.J.P.; CRUZ, M.C.; LIMA, F.M.; CORDERO, E.M.; YOSHIDA, M.; SILVEIRA, J.F.; MORTARA, R.A.; BAHIA, D. Unique behavior of *Trypanosoma cruzi* mevalonate kinase: A conserved glycosomal enzyme involved in host cell invasion and signaling. *Scientific Reports*, v.6, n. 24610, doi: 10.1038/ srep24610, 2016.
- GAESTEL, M.; KOTLYAROV, A.; KRACHT, M. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 8, n. 6, p. 480–499, 2009.
- GARAULET, G.; PÉREZ-CHACON, G.; ALARCÓN, H.; ALFRANCA, A.; MULERO, F.; MARTÍNEZ-TORRECUADRADA, J.; ZAPATA, J.M.; RODRÍGUEZ, A. Intratumoral expression using a NFκB-based promoter enhances IL12 antitumor efficacy. *Cancer Gene Therapy*, 2019.
- GILMORE, T. D. Introduction to NF-κB: Players, pathways, perspectives. *Oncogene*, v. 25, n. 51, p. 6680–6684, 2006.
- GREEN, D.R; LLAMBI, F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 7, n. 12, p. a006080, 2015.
- GRIMSEY, N.J.; NARALA, R.; RADA, C.C.; MEHTA, S.; STEPHENS, B.S.; KUFAREVA, J.L.; GONZALEZ, D.J.; HANDEL, J.Z.; TREJO, J. A Tyrosine Switch on NEDD4-2 E3 Ligase Transmits GPCR Inflammatory Signaling. *Cell reports*, v. 24, n. 12, p. 3312–3323, 2018.

GROOTJANS, J.; KASER, A.; KAUFMAN, R.J. BLUMBERG, R.S. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 8, p. 469–484, 27 ago. 2016.

HANKS, S.; QUINN, A.; HUNTER, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, v. 241, n. 4861, p. 42–52, 1988.

HANKS, S K; HUNTER, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB Journal*, v. 9, n. 8, p. 576–596, 1995.

HIGUERA, S.L.; GUHL, F.; RAMÍREZ, J.D. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites and Vectors*, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2013.

HU, Z.; TIE, Y.; LV, G.; ZHU, J.; FU, H.; ZHENG, X.; ZHU, J.; FU, HANJIANG; ZHENG, X. Transcriptional activation of miR-320a by ATF2, ELK1 and YY1 induces cancer cell apoptosis under ionizing radiation conditions. *International Journal of Oncology*, v. 53, n. 4, p. 1691–1702, 2018.

HUANG, G.; SHI, L.Z.; CHI, H. Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination. *Cytokine*, v. 48, n. 3, p. 161–169, 2009.

IHLE, J.N. Cytokine receptor signalling. *Nature*, v. 377, n. 6550, p. 591–594, 1995.

INOUE, S.; MIZUSHIMA, T.; IDE, H.; JIANG, G., GOTO, T.; NAGATA, Y.; NETTO, G.J.; MIYAMOTO, H. ATF2 promotes urothelial cancer outgrowth via cooperation with androgen receptor signaling, v. 7, n.12, 2018.

JEFFREY, K.L.; CAMPS, M.; ROMMEL, C., MACKAY, C.R. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 6, n. 5, p. 391–403, 2007.

JOHNSON, L.N; NOBLE, M.E.M. *Active and Inactive Protein Kinases: Review Structural Basis for Regulation*. *Cell.*, v. 2, n. 85, p. 149-158, 1996.

JORGE, T.C.A.; CASTRO, S.L. Doença de chagas: manual para experimentação animal [online]. 2000. p. 368. *Antropologia e Saúde collection*. SciELO Books. ISBN 85-85676-75-2. Disponível em: <<http://books.scielo.org>>. Acessado em: 21 jan. 19.

- KOLCH, W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 6, n. 11, p. 827–837, 2005.
- KUMAR, S.; BOEHM, J.; LEE, J.C. P38 MAP kinases: Key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 2, n. 9, p. 717–726, 2003.
- KYRIAKIS, J.M. Activation of the AP-1 transcription factor by inflammatory cytokines of the TNF family. *Gene expression*, v. 7, n. 4–6, p. 217–31, 1999.
- LAHIRY, P.; TORKAMANI, A., SCHORK, N.J.; HEGELE, R.A. Kinase mutations in human disease: Interpreting genotype-phenotype relationships. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, n. 1, p. 60–74, 2010.
- LANDRY, J.J.M.; PYL, P.T.; RAUSCH, T.; ZICHNER, T.; TEKKEDIL, M.M.; STÜTZ, A.M.; JAUCH, A.; AIYAR, R.S.; PAU, G., DELHOMME, N.; GAGNEUR, J.; KORBEL, J.O.; HUBER, W.; STEINMETZ, L.M. The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, v. 3, n. 8, p. 1213–1224, 2013.
- LEMMON, M.A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, v. 141, n. 7, p. 1117–1134, 2010.
- LEY, V.; ANDREWS, N.W.; ROBBINS, E.D.; NUSSENZWEI, V. *Trypanosoma cruzi*: mechanisms of cell-invasion and intracellular survival. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 83 Suppl 1, n. August, p. 452–455, 1988.
- LIMA, F. M.; OLIVEIRA, P.; MORTARA, R. A., SILVEIRA, J. F.; BAHIA, D. The challenge of Chagas' disease: Has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? *New Biotechnology*, v. 27, n. 6, p. 837–843, 2010.
- LIN, Y.; WEI, P.; TSAI, Y., WONG, J.; CHANG, C.; WANG, J.; HOU, M.; LEE, Y.; CHANG, W. Pb<sup>2+</sup> induced IL-8 gene expression by extracellular signal-regulated kinases and the transcription factor, activator protein 1, in human gastric carcinoma cells. *Environmental Toxicology*, v. 30, n. 3, p. 315–322, 2015.
- LIU, X.; ZHANG, C.S.; LU, C.; LIN, S.C.; WU, J.W.; WANG, Z.X. A conserved motif in JNK/p38-specific MAPK phosphatases as a determinant for JNK1 recognition and inactivation. *Nature Communications*, v. 7, p. 1–12, 2016.
- LIU, Y; SHEPHERD, E.G.; NELIN, L.D. MAPK phosphatases - Regulating the immune response. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, n. 3, p. 202–212, 2007.

LU, J.T.; XU, A.T.; SHEN, J. RAN, Z.H. Crosstalk between intestinal epithelial cell and adaptive immune cell in intestinal mucosal immunity. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, v. 32, n. 5, p. 975–980, 2017.

MAGDESIAN, M.H.; TONELLI, R.R.; FESSEL, M.R.; SILVEIRA, M.S.; SCHUMACHER, R.I.; LINDEN, R.; COLLI, W.; ALVES, M.J. A conserved domain of the gp85/trans-sialidase family activates host cell extracellular signal-regulated kinase and facilitates *Trypanosoma cruzi* infection. *Experimental Cell Research*, v. 313, n. 1, p. 210–218, 2007.

MANNING, G.; WHYTE, D. B.; MARTINEZ, R.; HUNTER, T.; SUDARSANAM, S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*, v. 298, n. 5600, p. 1912–1934, 2002.

MARTELLI, A.M.; NYÅKERN, M.; TABELLINI, G. BORTUL, R.; TAZZARI, P.L.; EVANGELISTI, C.; COCCO, L. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia*, v. 20, n. 6, p. 911–928, 2006.

MARTIN, J.; ANAMIKA, K.; SRINIVASAN, N. Classification of protein kinases on the basis of both kinase and non-kinase regions. *PLoS ONE*, v. 5, n. 9, p. 1–12, 2010.

MAURICE, D.; COSTELLO, P.; SARGENT, M.; TREISMAN, R. ERK Signaling Controls Innate-like CD8 + T Cell Differentiation via the ELK4 (SAP-1) and ELK1 Transcription Factors. *The Journal of Immunology*, v. 201, p. 1681–1691, 2018.

MELO, T.G.; TUCCI, A.R.; NOGUEIRA, A.R; MEIRELLES, M.N.S.L.; PEREIRA, M.C.S. The involvement of FAK and Src in the invasion of cardiomyocytes by *Trypanosoma cruzi*. 2014.

MENGES, C W; MCCANCE, D J. Constitutive activation of the Raf-MAPK pathway causes negative feedback inhibition of Ras-PI3K-AKT and cellular arrest through the EphA 2 receptor. *Oncogene*, v. 27, n. 20, p. 2934–2940, 2008.

MILLER, C.J.; TURK, B.E. Homing in: Mechanisms of Substrate Targeting by Protein Kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 43, n. 5, p. 380–394, 2018.

MIN, D.Y.; JUNG, E.; KIM, J.; LEE, Y. H. Leptin stimulates IGF-1 transcription by activating AP-1 in human breast cancer cells. *The journal of reproduction and development*, v. 60, n. 3, p. 216–223, 2014.

MODY, A.; WEINER, J.; RAMANATHAN, S. Modularity of MAP kinases allows deformation of their signalling pathways. *Nature Cell Biology*, v. 11, n. 4, p. 484–491, 2009.

MOLINA, I.; SULLEIRO, E.; SERRE, N.; POU, D.; ROURE, S.; CABEZOS, J.; VALERIO, L.; BLANCO-GRAU, A.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; VIDAL, X.; PAHISSA, A. Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*, v. 370, n. 20, p. 1899–1908, 2014.

MORTARA, R.A.; PROCÓPIO, D.O.; BARROS, H.C.; VERBISCK, N.V.; ANDREOLI, W.K.; SILVA, R.B.S.; SILVA, S. Features of Host Cell Invasion by Different Infective Forms of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 1, p. 135–137, 1999.

MORTARA, R.A.; ANDREOLI, W.K.; TANIWAKI, N.N.; FERNANDES, A.B.; SILVA, C.V.; FERNANDES, M.C.D.C.; L'ABBATE, C.; SILVA, S. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 77, n. 1, p. 77–94, 2005.

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

MOYES, D.L.; RUNGLALL, M.; MURCIANO, C.; SHEN, C.; NAYAR, D.; THAVARAJ, S.; KOHLI, A.; ISLAM, A.; MORA-MONTES, H.; CHALLACOMBE, S.J.; NAGLIK, J.R. A biphasic innate immune MAPK response discriminates between the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* in epithelial cells. *Cell host & microbe*, v. 8, n. 3, p. 225–35, 2010.

MUKHERJEE, S.; HUANG, H.; PETKOVA, S.B.; ALBANESE, C.; PESTELL, R.G.; BRAUNSTEIN, V.L. ; CHRIST, G.J.; WITTNER, M.; LISANTI, M.P.; BERMAN, J.W.; WEISS, L.M.; TANOWITZ1, H.B. *Trypanosoma cruzi* Infection Activates Extracellular Signal-Regulated Kinase. *Infection and immunity*, v. 72, n. 9, p. 5274–5282, 2004.

NAKAHARA, M., OKUMURA, N., NAKANO, S.; KOIZUMI, M. Effect of a p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor on Corneal Endothelial Cell Proliferation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 59, n. 10, p. 4218, 2018.

NANDAN, D.; LO, R.; REINER, N.E. Activation of Phosphotyrosine Phosphatase Activity Attenuates Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling and Inhibits c-FOS and Nitric Oxide Synthase Expression in Macrophages Infected with *Leishmania donovani*. *Infection and immunity*. v. 67, n. 8, p. 4066-4063, 1999.

NENNIG, S.E.; SCHANK, J.R. The Role of NF $\kappa$ B in Drug Addiction: Beyond Inflammation. *Alcohol and Alcoholism*, v. 52, n. 2, p. 172-179, 2017.

OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF- $\kappa$ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 1, n. 4, p. a000034, 2009.

OPAS. Doença de Chagas: Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de chagas aguda transmitida por alimentos. *Journal of Chemical Information and Modeling*, p. 160, 2009.

OWENS, D M; KEYSE, S M. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*, v. 26, p. 3203–3213, 2007.

PATEL, N.N.; KOHANSKI, M.A.; WORKMAN, A.D.; HERBERT, D.R.; COHEN, N.A. Sentinels at the wall: epithelial-derived cytokines serve as triggers of upper airway type 2 inflammation. *International Forum of Allergy and Rhinology*, v. 9, n. 1, p. 93–99, 2018.

PEARSON, G.; ROBINSON, F.; BEERS, G.T.; XU, B.E.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M.H. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions<sup>1</sup>. *Endocrine Reviews*, v. 22, n. 2, p. 153–183, 2001.

PÉREZ-MOLINA, J.A; MOLINA, I. Chagas disease. *The Lancet*, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018.

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

RAMAN, M; CHEN, W; COBB, M H. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, v. 26, n. 22, p. 3100–3112, 2007.

REIS-CUNHA, J.L.; VALDIVIA, H.O.; BARTHOLOMEU, D.C. Gene and Chromosomal Copy Number Variations as an Adaptive Mechanism Towards a Parasitic Lifestyle in Trypanosomatids. *Current Genomics*, v. 19, n.2, p. 87-97, 2018.

REIS-CUNHA, J.L.; RODRIGUES-LUIZ, G.F.; VALDIVIA, H.O.; BAPTISTA, R.P.; MENDES, T.A.; MORAIS, G.L.M.; GUEDES, R.; MACEDO, A.M.; BERN, C.GILMAN, R.H.; LOPEZ, C.T.; ANDERSSON, B.; VASCONCELOS, A.T.; BARTHOLOMEU, D.C.

Chromosomal copy number variation reveals differential levels of genomic plasticity in distinct *Trypanosoma cruzi* strains. *BMC Genomic*, v. 16, n. 499, 2015

RISS, T.L.; MORAVEC, R.A.; NILES, A.L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H.A.; WORZELLA, T.J.; MINOR, L. Cell Viability Assays. *Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences*, 2013.

RODRIGUES, A.A.; CLEMENTE, T.M.; DOS SANTOS, M.A.; MACHADO, F.C.; GOMES, R.G.B.; MOREIRA, H.H.T.; CRUZ, M.C.; BRÍGIDO, P.C.; SANTOS, P.C.F.; MARTINS, F.A.; BAHIA, D.; MARICATO, J.T.; JANINI, L.M.R., DA SILVA, C.V. A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* P21 enhances phagocytosis. *PLoS one*, v. 7, n. 12, p. e51384, 2012.

RODRIGUES, M.M.; OLIVEIRA, A.C.; BELLIO, M.. The immune response to *Trypanosoma cruzi*: Role of toll-like receptors and perspectives for vaccine development. *Journal of Parasitology Research*, v. 2012, p. 1-12, 2012.

ROMAGNANI, S. Regulation of the T cell response. Clinical and experimental allergy. *Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, v. 36, n. 11, p. 1357–1366, 2006.

RUB, A.; DEY, R.; JADHAV, M.; KAMAT, R.; CHAKKARAMAKKIL, S.; MAJUMDAR, S.; MUKHOPADHYAYA, R.; SAHA, B. Cholesterol depletion associated with *Leishmania major* infection alters macrophage CD40 signalosome composition and effector function. *Nature Immunology*, v. 10, n. 3, p. 273–280, 2009.

SAXTON, R.A.; SABATINI, D.M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, v. 168, n. 6, p. 960–976, 2017.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SCHMUNIS, G.A.; YADON, Z.E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, 2010.

SILVA, B.V.; HORTA, B.A. C.; ALENCASTRO, R.B.; PINTO, A.C. Proteínas quinases: Características estruturais e inibidores químicos. *Química Nova*, v. 32, n. 2, p. 453–462, 2009.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C.

Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.

SIMON, J.; ARTHUR, C.; LEY, S.C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 9, p. 679–692, 2013.

SOARES-SILVA, M.; DINIZ, F.F.; GOMES, G.N.; BAHIA, D. The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway: Role in immune evasion by trypanosomatids. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n.183, p. 1–9, 2016.

SOBRINHO, J.L.S.; FONTES, D.A.F.; LYRA, M.A.M.; SOARES, M.F.L.R.S.; NETO, P.J.R. Doença de Chagas: 100 anos de descoberta. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 90, n. 4, p. 283–289, 2009.

SOCESP. Atualização em Doença de Chagas: Aspectos epidemiológicos e clínicos da doença de Chagas aguda no Brasil e na América Latina. *Revista da Sociedade Cardiologia do Estado de São Paulo*, v. 26, n. 4, p. 222–229, 2016.

SOUZA, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current pharmaceutical design*, v.8, n. 4, p. 269–285, 2002.

SRIVASTAVA, NEETU; SUDAN, RAKI; SAHA, BHASKAR. Infection Leishmania major and MKP-3 Reciprocally Regulate Phosphatases MAPK Phosphatase (MKP)-1 CD40-Modulated Dual-Specificity. *J Immunol References*, v. 186, p. 5863–5872, 2011.

SUSHMITA CHAKRABORTY, ANKITA SRIVASTAVA, MUKESH KUMAR JHA, ARATHI NAIR, SURYA PRAKASH PANDEY, NEETU SRIVASTAVA, SANGEETA KUMARI, SHAILZA SINGH, Musti V. and Krishnasastry and; BHASKAR SAHA. Infection Leishmania major Reduces Inhibition of CD40-Induced N-Ras Activation. *The Journal of immunology*, v. 194, n. 8, p. 3852-3860, 2015.

SZALMÁS, A.; BÁNÁTI, F.; KOROKNAI, A.; LÁSZLÓ, B.; FEHÉR, E.; SALAMON, D.; GERGELY, L; MINÁROVITS, J; KÓNYA, J. Lineage-specific silencing of human IL-10 gene expression by promoter methylation in cervical cancer cells. *European Journal of Cancer*, v. 44, n. 7, p. 1030–1038, 2008.

TOMLINSON, S.; VANDEKERCKHOVE, F; FREVERT, U; NUSSENZWEIG, V. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology*, v. 110, n. 05, p. 547, 1995.

TURJANSKI, A. G.; VAQUÉ, J. P.; GUTKIND, J. S. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*, v. 26, n. 22, p. 3240–3253, 2007.

TURJANSKI, A.G.; VAQUEÁND, J.P.; GUTKIND, J S. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*, v. 26, p. 3240–3253, 2007.

URBINA, J.A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: Advances, challenges and perspectives. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 62, n. 1, p. 149–156, 2015.

VARGA, J.F.A.; BUI-MARINOS, M.P.; KATZENBACK, B.A. Frog Skin Innate Immune Defences: Sensing and Surviving Pathogens. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. January, p. 1–21, 2019.

WANG, S.; WANG, S.C.; CHEN, P.; WANG, S.T.; LIU, Y. Induction of cyclooxygenase-2 gene by *Candida albicans* through EGFR, ERK, and p38 pathways in human urinary epithelium. *Medical Mycology*, v. 55, p. 314–322, 2017.

WILKOWSKY, S.E.; BARBIERI, M.A.; STAHL, P.; ISOLA, E.L. *Trypanosoma cruzi*: Phosphatidylinositol 3-Kinase and Protein Kinase B Activation Is Associated with Parasite Invasion. *Experimental Cell Research*, v. 264, n. 2, p. 211–218, 2001.

YATIM, K.M.; LAKKIS, F.G. A brief journey through the immune system. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 10, n. 7, p. 1274–1281, 2015.

YOSHIDA, N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity*, v. 40, n. 2, p. 836–8399, 1983.

ZHIHONG, W.; COLE, P.A. Catalytic Mechanisms and Regulation of Protein Kinases. *Methods Enzimology*, n. 548, p. 1–21, 2014.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.; 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, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to Tc. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.

ZINGALES, B.; MILES, M.A.; MORAES, C.B.; LUQUETTI, A.; GUHL, F.; SCHIJMAN, A.G.; RIBEIRO, I. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 6, p. 828–33, 2014.

ZINGALES, B.; MILES, M.A.; CAMPBELL, D.A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.M.; TEIXEIRA, M.M.; SCHIJMAN, A.G.; LLEWELLYN, M.S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C.R.; ANDRADE, S.G.; STURM, N.R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, n. 2, p. 240–253, 2012.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? *Revista da Biologia*, v. 6b, p. 44–48, 2011.

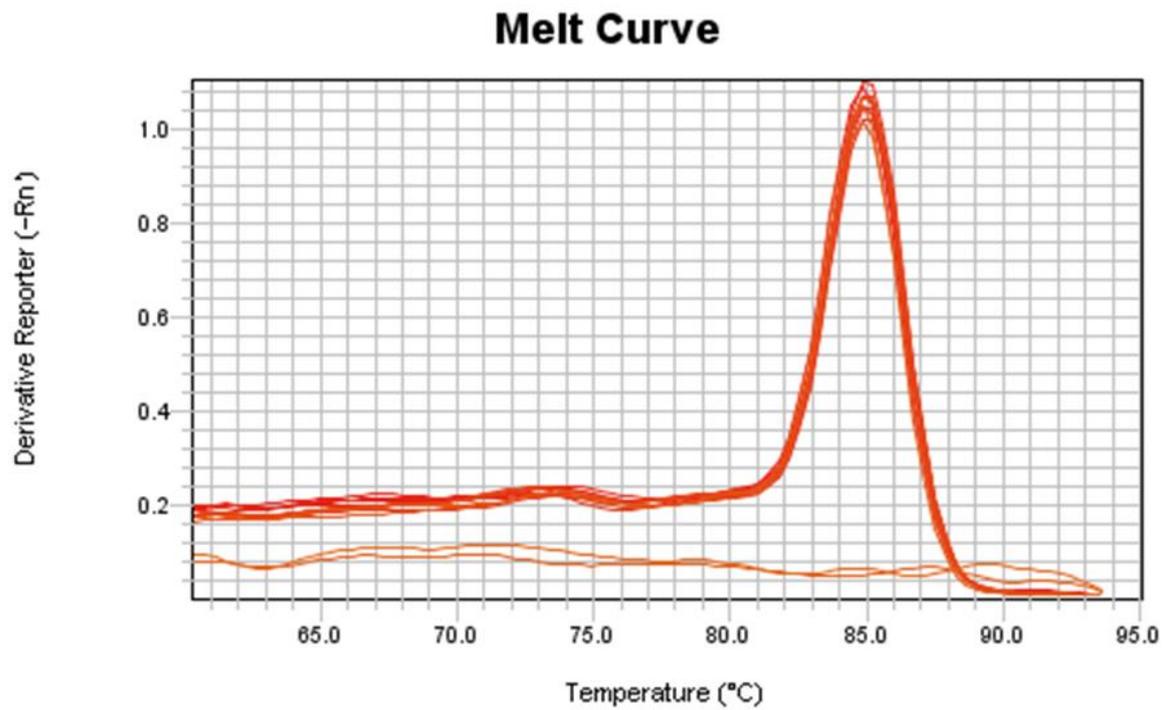
ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, v. 184, p. 38–52, 2018.

## 9. Anexos

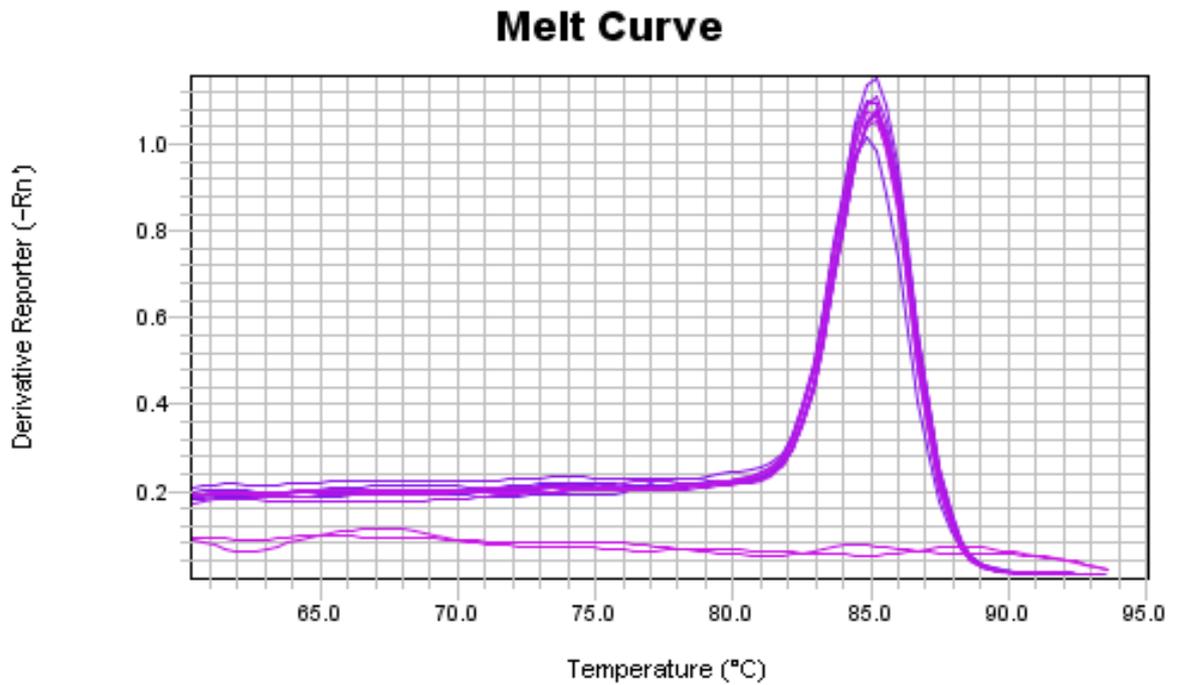
### Anexo I – Curvas de dissociação (RT-PCR)

#### 1. GADPH

##### (A) Cepa G



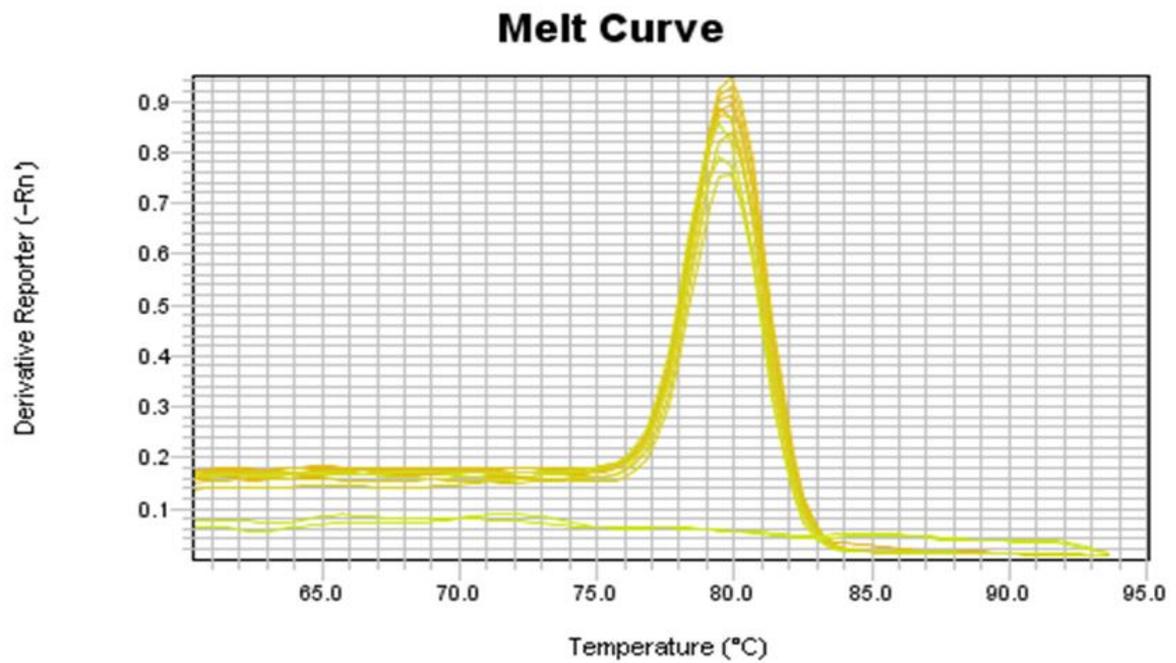
**Figura A.** Curva de dissociação referente a reação de RT-PCR utilizando GADPH – Cepa G. Temperatura de dissociação entre 81 e 88° C. O aparecimento de um único pico na curva de dissociação sugere a existência de um único produto de amplificação. Curvas inferiores correspondem ao mix branco (sem amostra, apenas iniciadores).

**(B) Cepa CL**

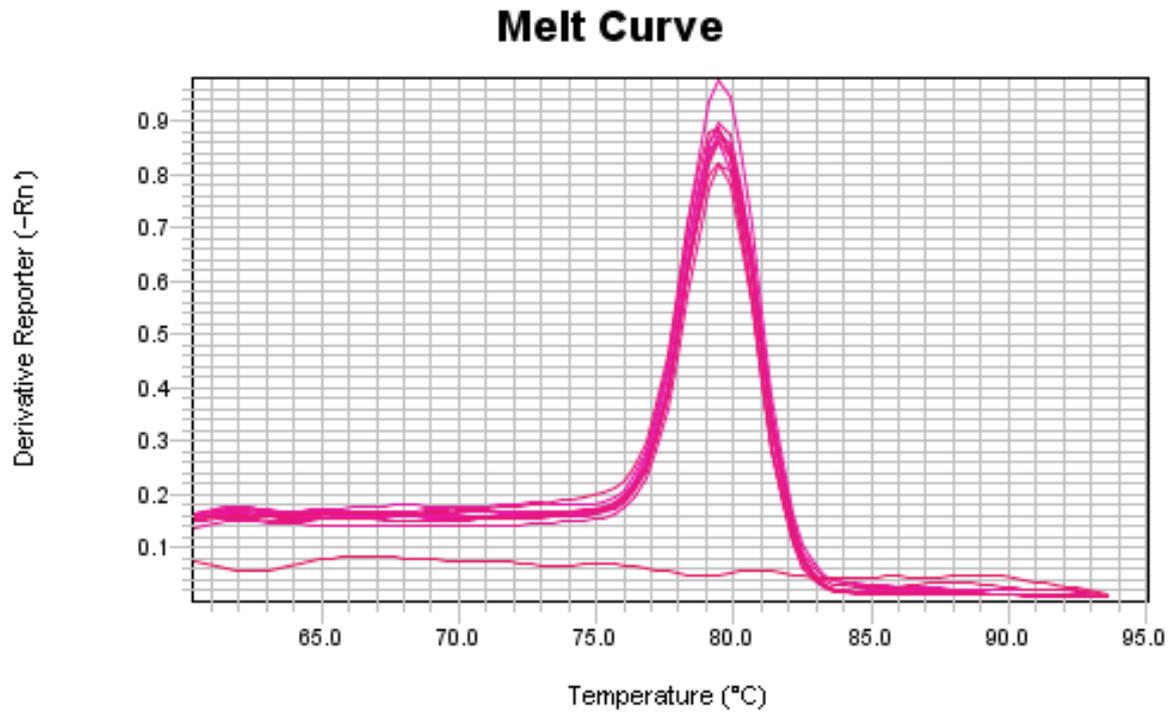
**Figura B.** Curva de dissociação referente a reação de RT-PCR utilizando GADPH – Cepa CL. Temperatura de dissociação entre 81 e 88° C. O aparecimento de um único pico na curva de dissociação sugere a existência de um único produto de amplificação. Curvas inferiores correspondem ao mix branco (sem amostra, apenas iniciadores).

## 2. $\beta$ -2-microglobulina

### (A) Cepa G



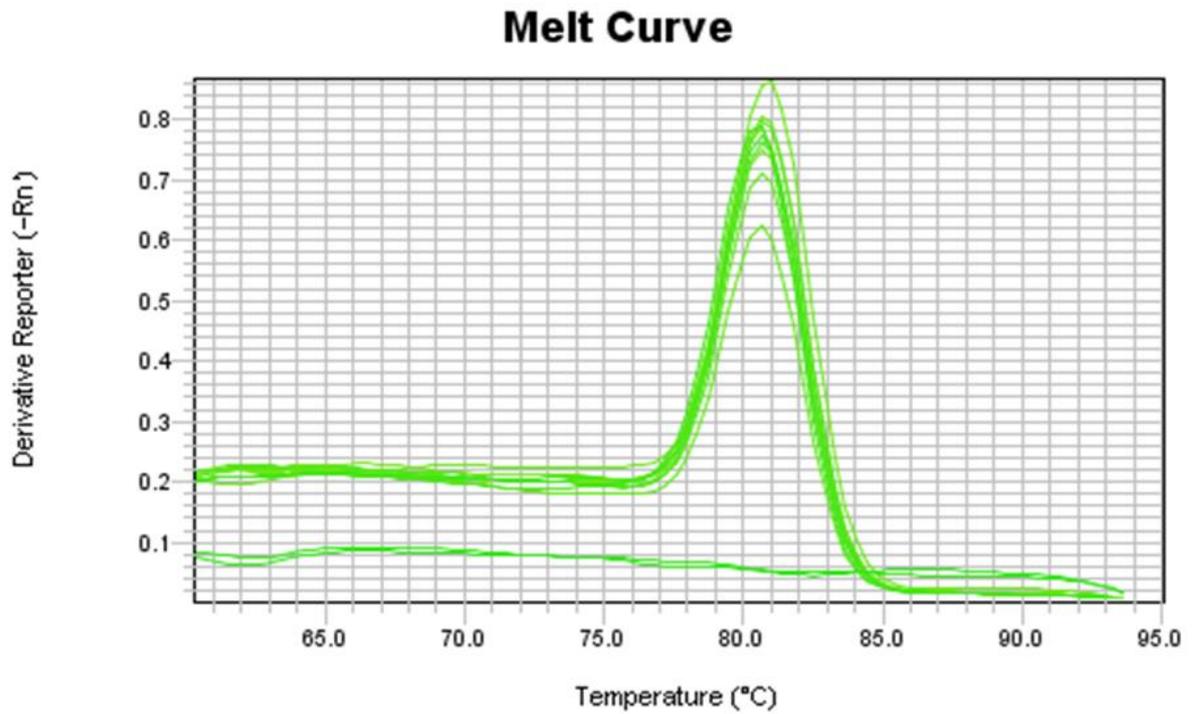
**Figura A.** Curva de dissociação referente a reação de RT-PCR utilizando  $\beta$ -2-microglobulina – Cepa G. Temperatura de dissociação entre 76 e 83° C. O aparecimento de um único pico na curva de dissociação sugere a existência de um único produto de amplificação. Curvas inferiores correspondem ao mix branco (sem amostra, apenas iniciadores).

**(B) Cepa CL**

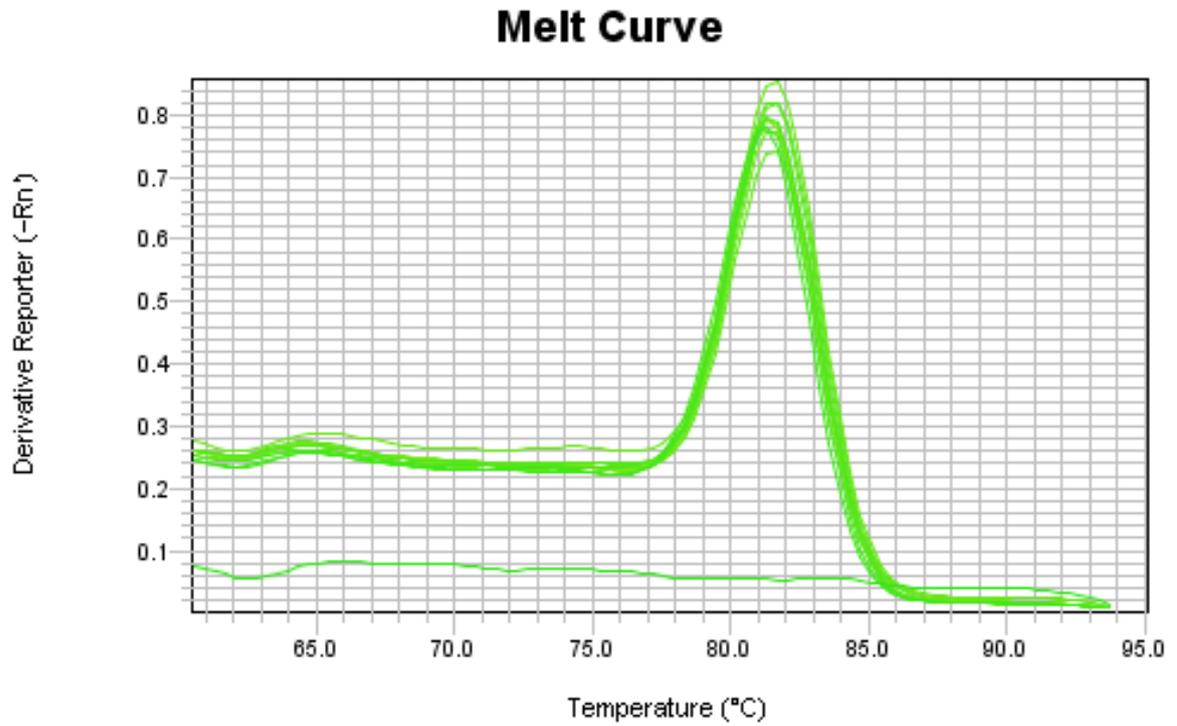
**Figura B.** Curva de dissociação referente a reação de RT-PCR utilizando  $\beta$ -2-microglobulina – Cepa CL. Temperatura de dissociação entre 76 e 83° C. O aparecimento de um único pico na curva de dissociação sugere a existência de um único produto de amplificação. Curvas inferiores correspondem ao mix branco (sem amostra, apenas iniciadores).

### 3. TNF- $\alpha$

#### (A) Cepa G



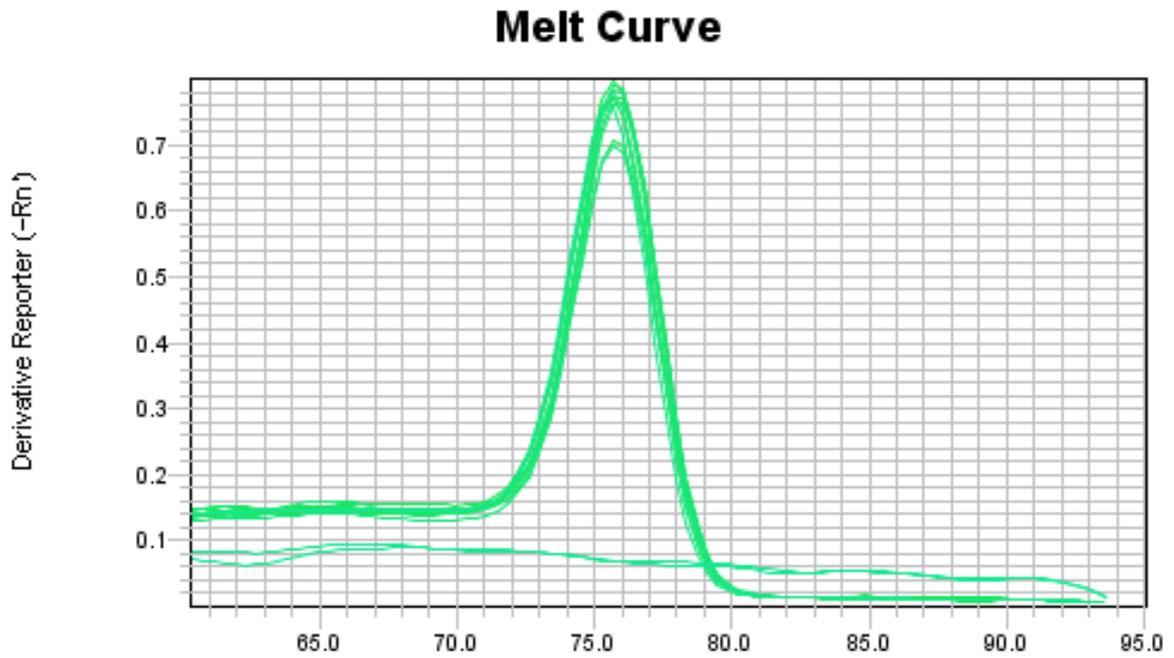
**Figura A.** Curva de dissociação referente a reação de RT-PCR utilizando TNF- $\alpha$  – Cepa G. Temperatura de dissociação entre 77 e 85° C. O aparecimento de um único pico na curva de dissociação sugere a existência de um único produto de amplificação. Curvas inferiores correspondem ao mix branco (sem amostra, apenas iniciadores).

**(B) Ceba CL**

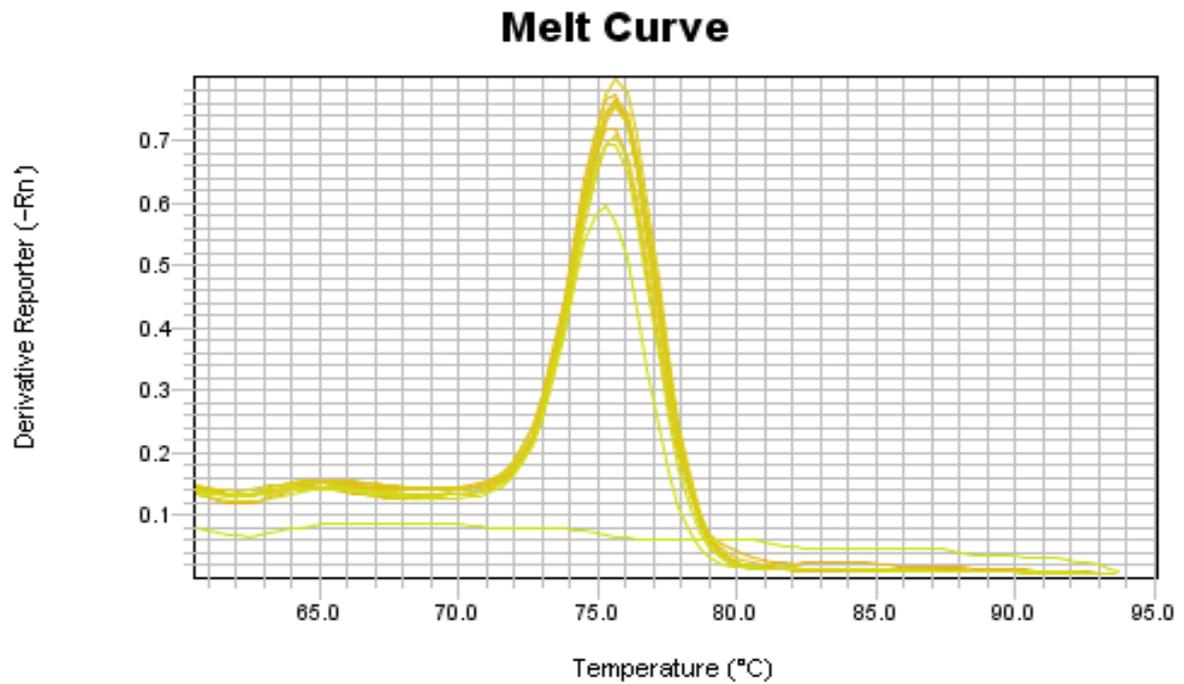
**Figura B.** Curva de dissociação referente a reação de RT-PCR utilizando TNF- $\alpha$  – Ceba CL. Temperatura de dissociação entre 77 e 85° C. O aparecimento de um único pico na curva de dissociação sugere a existência de um único produto de amplificação. Curvas inferiores correspondem ao mix branco (sem amostra, apenas iniciadores).

#### 4. IL-6

##### (A) Cepa G



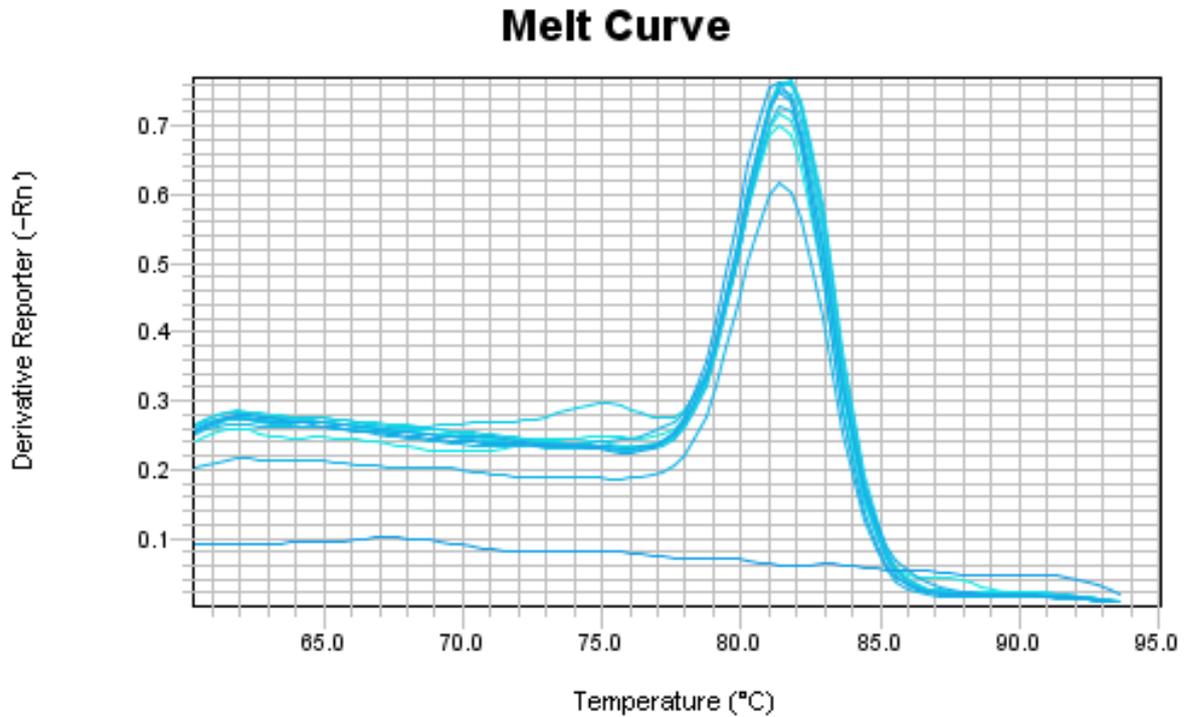
**Figura A.** Curva de dissociação referente a reação de RT-PCR utilizando IL-6 – Cepa G. Temperatura de dissociação entre 71 e 89° C. O aparecimento de um único pico na curva de dissociação sugere a existência de um único produto de amplificação. Curvas inferiores correspondem ao mix branco (sem amostra, apenas iniciadores).

**(B) Cepa CL**

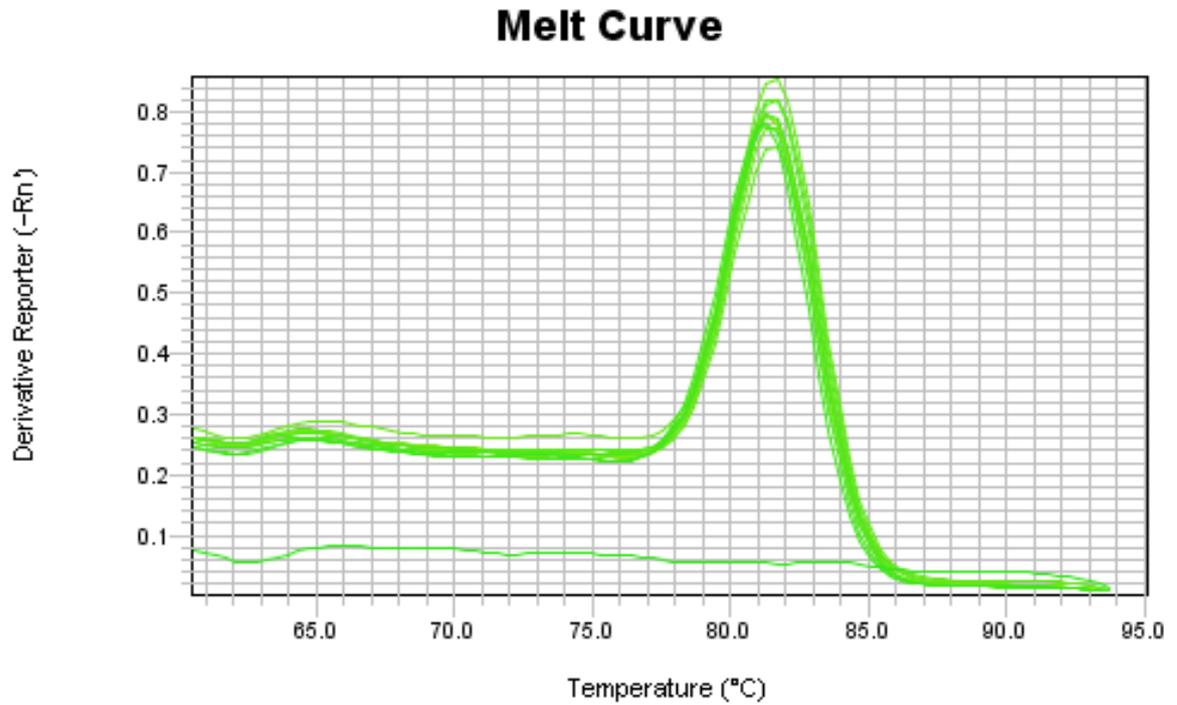
**Figura B.** Curva de dissociação referente a reação de RT-PCR utilizando IL-6 – Cepa CL. Temperatura de dissociação entre 71 e 89° C. O aparecimento de um único pico na curva de dissociação sugere a existência de um único produto de amplificação. Curvas inferiores correspondem ao mix branco (sem amostra, apenas iniciadores).

## 5. TGF- $\beta$

### (A) Cepa G



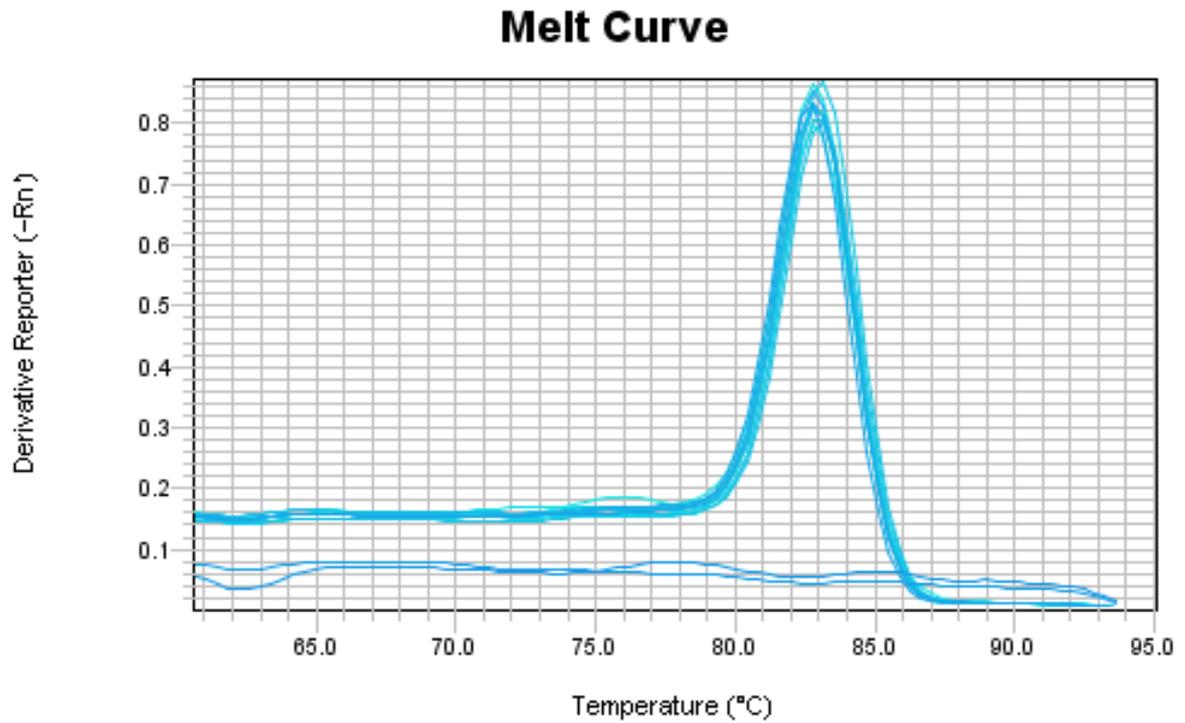
**Figura A.** Curva de dissociação referente a reação de RT-PCR utilizando TGF- $\beta$  – Cepa G. Temperatura de dissociação entre 77 e 86° C. O aparecimento de um único pico na curva de dissociação sugere a existência de um único produto de amplificação. Pequena curva a temperatura 75°C sugere formação de dímeros, porém não constatados durante o PCR convencional. Curvas inferiores correspondem ao mix branco (sem amostra, apenas iniciadores).

**(B) Cepa CL**

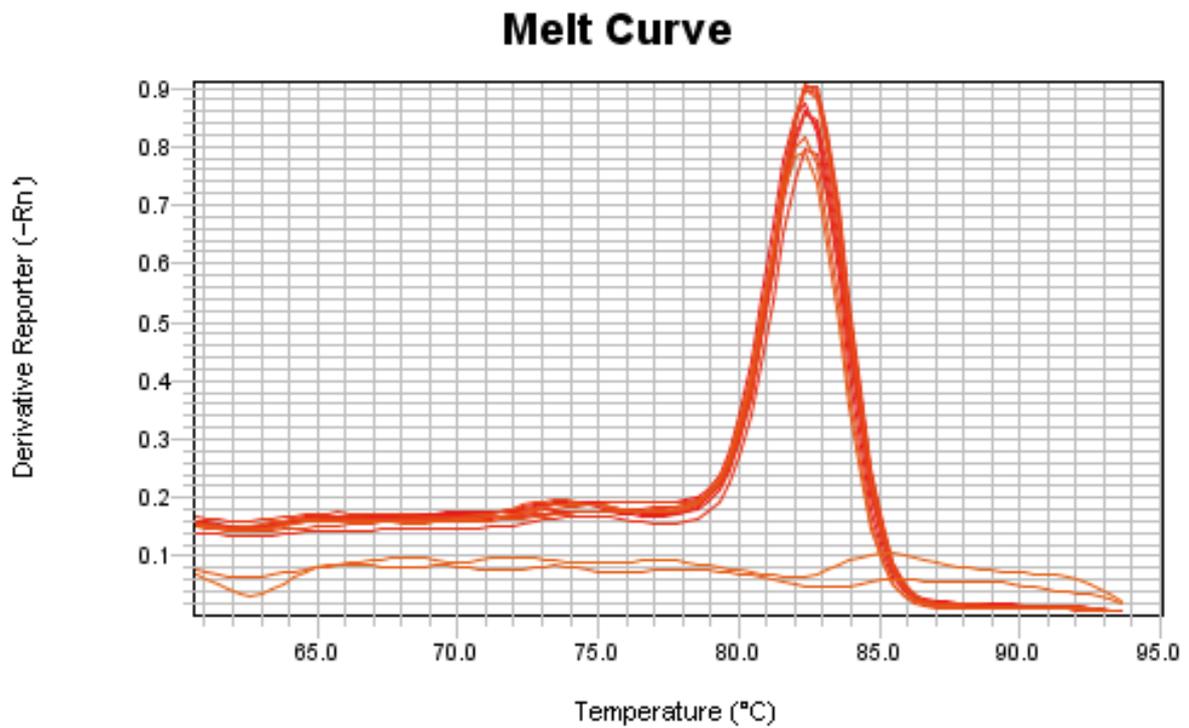
**Figura B.** Curva de dissociação referente a reação de RT-PCR utilizando TGF- $\beta$  – Cepa CL. Temperatura de dissociação entre 77 e 86° C. O aparecimento de um único pico na curva de dissociação sugere a existência de um único produto de amplificação. Curvas inferiores correspondem ao mix branco (sem amostra, apenas iniciadores).

## 6. ELK1

### (A) Cepa G



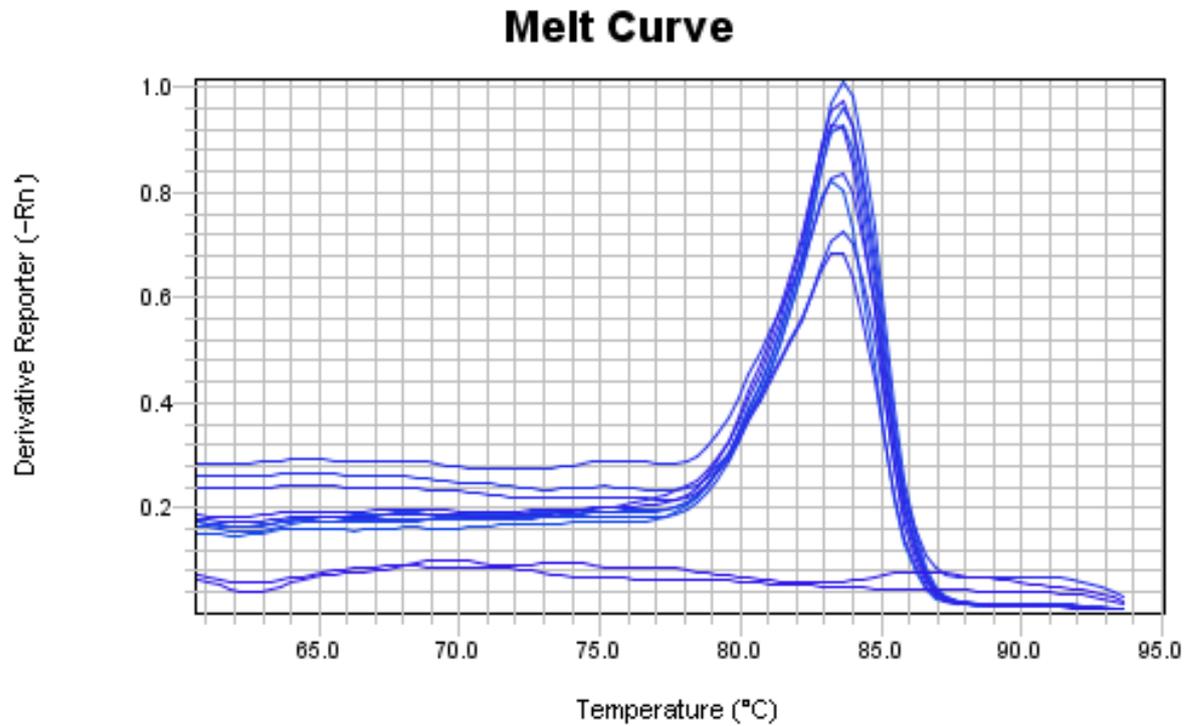
**Figura A.** Curva de dissociação referente a reação de RT-PCR utilizando ELK1 – Cepa G. Temperatura de dissociação entre 79 e 86° C. O aparecimento de um único pico na curva de dissociação sugere a existência de um único produto de amplificação. Curvas inferiores correspondem ao mix branco (sem amostra, apenas iniciadores).

**(B) Cepa CL**

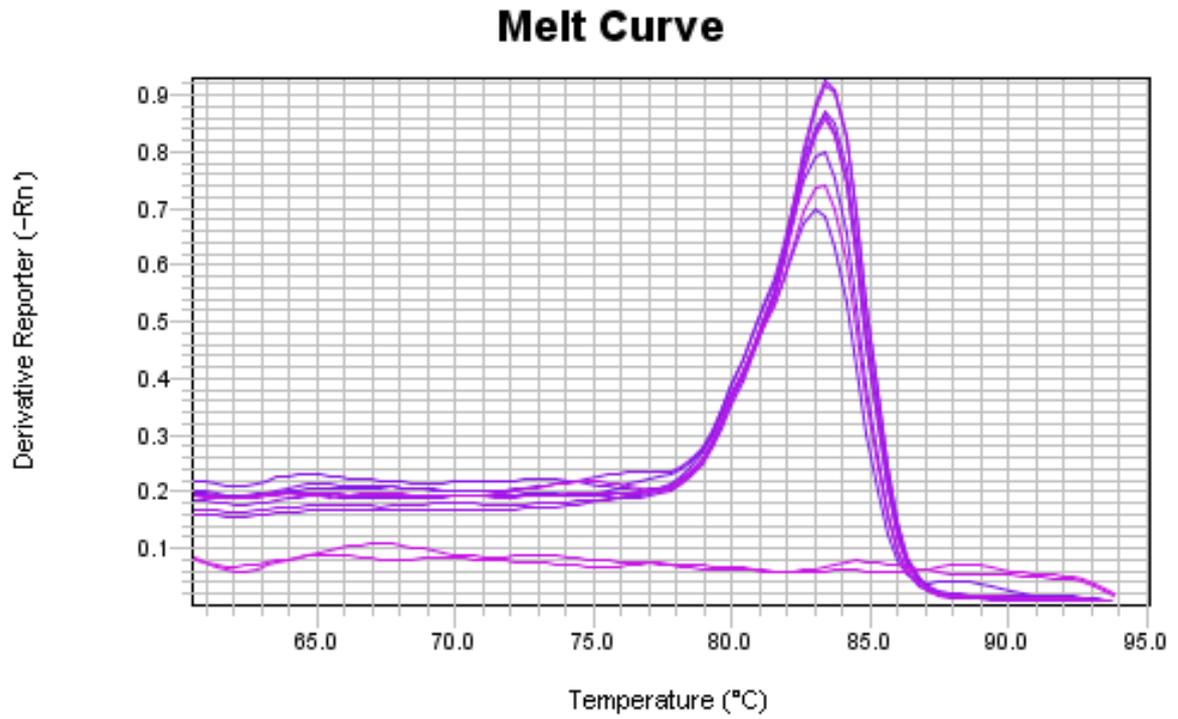
**Figura B.** Curva de dissociação referente a reação de RT-PCR utilizando ELK1 – Cepa CL. Temperatura de dissociação entre 79 e 86° C. O aparecimento de um único pico na curva de dissociação sugere a existência de um único produto de amplificação. Curvas inferiores correspondem ao mix branco (sem amostra, apenas iniciadores).

## 7. FOS

### (A) Cepa G



**Figura A.** Curva de dissociação referente a reação de RT-PCR utilizando FOS – Cepa G. Temperatura de dissociação entre 78 e 87° C. O aparecimento de um único pico na curva de dissociação sugere a existência de um único produto de amplificação. Curvas inferiores correspondem ao mix branco (sem amostra, apenas iniciadores).

**(B) Cepa CL**

**Figura B.** Curva de dissociação referente a reação de RT-PCR utilizando FOS – Cepa CL. Temperatura de dissociação entre 78 e 87° C. O aparecimento de um único pico na curva de dissociação sugere a existência de um único produto de amplificação. Curvas inferiores correspondem ao mix branco (sem amostra, apenas iniciadores).