



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

**O papel das espécies reativas de oxigênio na
infecção por *Trypanosoma cruzi***

Grazielle Ribeiro Goes

Belo Horizonte - MG

Maio – 2015

Grazielle Ribeiro Goes

**O papel das espécies reativas de oxigênio na
infecção por *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para a obtenção do título de Doutora em Imunologia.

Orientadora: Leda Quercia Vieira

Co-Orientador: Carlos Renato Machado

Belo Horizonte - MG

Maio – 2015



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
 31270-901 - Belo Horizonte - MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE GRAZIELLE ALVES RIBEIRO. Aos cinco dias do mês de maio de 2015 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "O papel das espécies reativas de oxigênio na infecção por *Trypanosoma cruzi*", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Leda Quercia Vieira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Maria Julia Manso Alves (Universidade de São Paulo), aprovada; Dra. Claudia Neto Paiva (Universidade Federal do RJ), aprovada; Dra. Fabiana Simão Machado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Flávio Almeida Amaral (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Carlos Renato Machado - Co-Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Leda Quercia Vieira - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 05 de maio de 2015.

Dra. Maria Julia Manso Alves (Universidade de São Paulo)

Dra. Claudia Neto Paiva (Universidade Federal do RJ)

Dra. Fabiana Simão Machado (UFMG)

Dr. Flávio Almeida Amaral (UFMG)

Dr. Carlos Renato Machado - Co-Orientador (UFMG)

Dr. Leda Quercia Vieira - Orientadora (UFMG)

Prof. Jader dos Santos Cruz
 Coordenador de Curso de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

*Dedico esse trabalho aos meus
pais, meu irmão e meu marido,
fontes de inspiração e amor.*

Agradecimentos

À minha orientadora, Dr^a Leda Quercia Vieira, pelo aprendizado e pelo direcionamento durante o desenvolvimento desta tese. Por estar sempre disponível, propondo ideias, questionando e incentivando. Obrigada pelos bons momentos proporcionados no laboratório ao longo desses anos.

Ao meu co-orientador Dr. Carlos Renato Machado, pela disponibilidade constante em auxiliar e sugerir ideias no desenvolvimento desse projeto. As discussões durante esse período contribuíram muito para o meu amadurecimento científico.

A Dr^a Lucía Piacenza pelo carinho com o qual me recebeu em seu laboratório e pelo aprendizado proporcionado durante meu doutorado sanduíche. Obrigada pelas ideias e pela disponibilidade constante em ajudar.

Ao Dr. Rafael Radi, por ter me recebido em seu laboratório. Obrigada pelo olhar crítico, pelas conversas sobre ciência e sugestões.

À Dr^a Fabiana Simão Machado, por sua contribuição fundamental na minha formação, disponibilizando seu laboratório e me ensinando a cultivar e entender melhor a biologia do *Trypanosoma cruzi*.

Aos colegas do Laboratório de Imunorregulação de Doenças Infecciosas, Ronan e Andréia, por me ensinarem com tanta paciência, a realizar infecções *in vivo* e *in vitro*, respectivamente. À Fátima, Lísia e Poliana, por me socorrerem sempre que possível, todas as vezes que precisei de reagentes ou parasitos.

A todos os integrantes do LAGI, por fazerem do nosso laboratório um ambiente harmonioso e divertido, onde trabalhar se torna mais prazeroso. Agradeço especialmente ao Waldionê, Matheus, Diego, Caio, Paula, Peter, Liliane e Ana Clara

pela amizade, conversas e boas risadas proporcionadas. Ao Diego também agradeço pela troca de ideias e pela constante boa vontade de ajudar. Ao Caio, agradeço também por me receber em sua casa todas as vezes que precisei.

Ao Peter, meu aluno de iniciação científica, pela parceria durante a realização de vários experimentos dessa tese. Obrigada por sua disponibilidade, por seu empenho, curiosidade e destreza na execução de todas as atividades propostas. Sua ajuda foi fundamental para a conclusão desse trabalho!

À minha grande amiga Lívia, pela amizade e pelos momentos felizes na UFMG. Obrigada pela força e incentivo de sempre, pelas risadas, pelas conversas e pela companhia constante.

Às agências financiadoras de pesquisa, CAPES e CNPq, que investiram no meu trabalho e formação acadêmica.

A Deus, que me deu força para suportar os momentos mais difíceis e fé para acreditar que eles seriam temporários.

Aos meus pais, Tânia e Jesus, por todo amor e carinho. O apoio de vocês foi essencial para que eu nunca desistisse. Não tenho palavras para explicar o quanto vocês são importantes em minha vida. Obrigada por terem me ensinado a importância do estudo e por terem me proporcionado a melhor educação possível.

Ao meu irmão, Robson, pela amizade e pelo incentivo constante, sempre me impulsionando na busca pelos meus ideais. Menino, obrigada por sempre ter acreditado em mim.

Finalmente, gostaria de agradecer ao meu marido, Eduardo, pela paciência, compreensão e espera. Obrigada meu amor, pelo seu apoio e carinho. Obrigada por me dar força para seguir em frente. Obrigada por fazer com que eu me sinta tão feliz, amada e completa.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. O <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.2. A Doença de Chagas	4
1.3. Invasão da célula hospedeira	8
1.4. O <i>Trypanosoma cruzi</i> e o estresse oxidativo	10
1.5. Maquinaria antioxidante do <i>T. cruzi</i>	14
1.6. Reparo de DNA em <i>T. cruzi</i>	17
1.7. O papel de ROS na infecção por <i>T. cruzi</i>	21
2. Objetivos	24
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. Material e Métodos	27
3.1. Cultivo de parasitos e células	28
3.2. Animais	29
3.3. Ensaio de infecção <i>in vitro</i>	30
3.4. Dosagem de Nitrito	31
3.5. Detecção de ROS	32
3.6. Oxidação de DHR (Dihidrorodamina)	32
3.7. Detecção de enzimas antioxidantes nos parasitos	33
3.8. Detecção de 8-oxoG	35
3.9. Experimentos de infecção <i>in vivo</i>	35
3.10. Análise Experimental	36
4. Resultados	37

4.1. O parasito <i>T. cruzi</i> induz a produção de ROS por macrófagos	38
4.2. Parasitos com atividade 8-oxo-dGTPase aumentada apresentam maior multiplicação em culturas de macrófagos	39
4.3. Modulação da produção de óxido nítrico por <i>T. cruzi</i>	41
4.4. Avaliação da multiplicação de parasitos resistentes ao estresse oxidativo <i>in vivo</i>	42
4.5. Oxidação de DHR e expressão de enzimas antioxidantes	43
4.6. As enzimas MTH e MutT previnem a incorporação de 8-oxo-dGTP no DNA de parasitos modificados	46
4.7. Macrófagos Phox KO apresentam parasitismo reduzido	47
4.8. Produção de NO por macrófagos Phox KO e C57BL/6 WT	50
4.9. Inibidores da produção de ROS reduzem a proliferação de <i>T. cruzi</i> em macrófagos	51
4.10. ROS podem servir como moléculas sinalizadoras importantes para a replicação do parasito <i>T. cruzi</i>	53
4.11. Parasitos que superexpressam a enzima catalase apresentam parasitismo aumentado em macrófagos	55
4.12. Altas concentrações de ROS não induzem o crescimento do parasito <i>T. cruzi</i> em macrófagos	57
4.13. Infecções <i>in vivo</i>	58
5. Discussão.....	61
6. Referências	81

Lista de Abreviaturas

8-oxodG	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
8-oxo-dGMP	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato
8-oxo-dGTP	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
8-oxoG	7,8-dihidro-8-oxoguanina ou 8-oxoguanina
APX	Heme-peroxidase dependente de ascorbato
ASC	Ascorbato
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
CamKII	Proteína cinase dependente de Cálcio/Calmodulina II
CAT-PEG	Catalase polietileno-glicol
CPX	Triparedoxina citosólica
DHA	Dehidroascorbato
DHR	Dihidrorodamina
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DPBS	Dulbecco's PBS
EDTA	Ácido etilenodiamina tetracético
GPX	Peroxidase dependente de glutationa
GSH	Glutationa
GSSG	Glutationa oxidada
IFN- γ	Interferon γ
LOOH	Hidroperóxidos orgânicos
LPS	Lipopolissacarídeo
Luminol	5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona
MPX	Triparedoxina mitocondrial

MTH	Homólogo de MutT
NAC	N-acetil-cisteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina fosfato oxidase
NOX2	NADPH oxidase do tipo 2
OGG	8-oxoguanina DNA glicosilase
PBS	Salina tamponada com fosfato
Phox KO	Camundongo nocaute para subunidade gp91 ^{phox} da NADPH oxidase
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PPP	Via das pentoses fosfato
RH123	Rodamina 123
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
SIN-1	Hidrocloreto de 3-morfolinosidnimina
SOD	Superóxido dismutase
SOD-PEG	Superóxido dismutase-polietileno glicol
T(SH) ₂	Tripanotiona di-thiol
TAU	<i>Triatomine artificial urine</i>
TR	Tripanotiona redutase
TS	Tripanotiona sintetase
TXN	Triparedoxina peroxidases

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Figura 2: Distribuição dos casos de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> no mundo.....	5
Figura 3: Número estimado de pessoas infectadas com <i>T. cruzi</i> em países não endêmicos.....	6
Figura 4: Processo de invasão do <i>T. cruzi</i>	10
Figura 5: Representação esquemática da enzima NADPH oxidase.	12
Figura 6: Sistema antioxidante do <i>T. cruzi</i>	16
Figura 7: Formação da 8-oxoG através de ROS.....	18
Figura 8: Pareamentos errôneos da 8-oxoG.....	19
Figura 9: A via de reparo a 8-oxoG.	20
Figura 10: Produção de ROS por macrófagos estimulados com <i>T. cruzi</i>	39
Figura 11: Parasitos transfectados com genes relacionados ao reparo de DNA apresentam maior capacidade replicativa.	41
Figura 12: Produção de NO por macrófagos infectados com diferentes populações da cepa CL Brener de <i>T. cruzi</i> após 48 horas.....	42
Figura 13: Parasitos transfectados com o gene MutT de <i>E. coli</i> apresentam níveis de parasitemia elevados.....	43
Figura 14: Análise da oxidação intracelular de DHR e expressão de enzimas antioxidantes em <i>T. cruzi</i>	45
Figura 15: As enzimas MTH e MutT previnem a incorporação de 8-oxo-dGTP.....	47
Figura 16: Macrófagos Phox KO apresentam parasitismo reduzido.....	49
Figura 17: Produção de NO por macrófagos Phox KO e C57BL/6 WT.....	50
Figura 18: Antioxidantes reduzem a proliferação de <i>T. cruzi</i> em macrófagos.....	52

Figura 19: O parasito <i>T. cruzi</i> precisa de um sinal proveniente das ROS para se multiplicar em macrófagos.....	54
Figura 20: Parasitos que superexpressam a enzima catalase apresentam parasitismo aumentado em macrófagos	56
Figura 21: Em altas concentrações, ROS não promovem o crescimento do parasito <i>T. cruzi</i>	58
Figura 22: Parasitemia e mortalidade de camundongos C57BL/6 WT e Phox KO infectados com parasitos TcWT e TcMTH	60

Resumo

Durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*, macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) em um processo chamado explosão respiratória. Diversos trabalhos têm tentado elucidar o papel das ROS durante a infecção pelo *T. cruzi*, mas os resultados obtidos algumas vezes são contraditórios. Embora o *T. cruzi* possua uma maquinaria antioxidante eficientemente regulada para lidar com a explosão respiratória, suas macromoléculas, particularmente seu DNA, ainda podem sofrer danos oxidativos. Devido ao seu baixo potencial redox, a guanina é a base mais vulnerável e sua oxidação resulta na formação de 8-oxoG, um marcador celular de estresse oxidativo. A fim de se verificar a contribuição das ROS na sobrevivência e infecção do parasito *T. cruzi*, foram utilizados camundongos nocautes para a subunidade gp91^{phox} da NADPH oxidase (Phox KO) e parasitos que superexpressam enzimas responsáveis pela remoção de 8-oxo-dGTP do conjunto de nucleotídeos. Os parasitos modificados apresentaram maior replicação em macrófagos de camundongos C57BL/6 WT quando comparados aos parasitos controle. Interessantemente, macrófagos de camundongos Phox KO infectados com estes parasitos, apresentaram um número reduzido de parasitos quando comparados com macrófagos de C57BL/6 WT. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam um papel paradoxal para as ROS, uma vez que parasitos modificados multiplicam-se melhor em macrófagos, mas têm sua capacidade de replicação significativamente reduzida quando a produção de ROS é inibida na célula hospedeira. Nossos resultados sugerem que baixas concentrações de ROS podem funcionar como moléculas sinalizadoras, contribuindo para o crescimento dos parasitos no interior das células.

Abstract

During *Trypanosoma cruzi* infection, macrophages produce reactive oxygen species (ROS) in a process called respiratory burst. Several works have aimed to elucidate the role of ROS during *T. cruzi* infection and the results obtained are sometimes contradictory. *T. cruzi* has a highly efficiently regulated antioxidant machinery to deal with the oxidative burst, but the parasite macromolecules, particularly DNA, may still suffer oxidative damage. Guanine (G) is the most vulnerable base and its oxidation results in formation of 8-oxoG, a cellular marker of oxidative stress. In order to investigate the contribution of ROS in *T. cruzi* survival and infection, we utilized mice deficient in the gp91^{phox} (Phox KO) subunit of NADPH oxidase and parasites that overexpress the enzyme EcMutT (from *Escherichia coli*) or TcMTH (from *T. cruzi*), which is responsible for removing 8-oxo-dGTP from the nucleotide pool. The modified parasites presented enhanced replication inside murine inflammatory macrophages from C57BL/6 WT mice when compared with control parasites. Interestingly, when Phox KO macrophages were infected with these parasites, we observed a decreased number of all parasites when compared with macrophages from C57BL/6 WT. In Phox KO macrophages we did not observe exacerbation of the infection. Our results indicate a paradoxical role for ROS, since modified parasites multiply better inside macrophages, but its proliferation is significantly reduced when ROS production is inhibited in host cell. Our findings suggest that lower concentrations of ROS can work like a signaling molecule, contributing to growth of this parasite inside the cells.

1. Introdução

1.1. O *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi*, agente causador da Doença de Chagas é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae e apresenta o ciclo de vida do tipo heteroxênico, que alterna entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. Uma das características dos tripanosomatídeos é a mudança de formato durante seu ciclo de vida. Entre os tripanosomatídeos, o *T. cruzi* apresenta o ciclo de vida mais complexo, com diversos estágios de desenvolvimento: as formas amastigotas e tripomastigotas, encontradas nos hospedeiros vertebrados; e as epimastigotas, esferomastigotas e tripomastigotas metacíclicas encontradas nos insetos vetores (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010).

O ciclo de vida do parasito se inicia quando, ocasionalmente, um inseto triatomíneo da família Reduviidae se alimenta do sangue de um hospedeiro vertebrado infectado e ingere as formas tripomastigotas do *T. cruzi*. Uma vez ingeridas, grande parte das tripomastigotas sanguíneas são lisadas no estômago do inseto vetor (CASTRO *et al.*, 2007). Poucos dias depois, as tripomastigotas sobreviventes diferenciam-se em formas epimastigotas ou em formas esféricas chamadas esferomastigotas. No intestino posterior do inseto, as formas epimastigotas não infectivas se multiplicam e diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas altamente infectivas, que são transmitidas para o hospedeiro vertebrado durante um novo repasto sanguíneo (ANDRADE; ANDREWS, 2005; BRENER, 1973; DE; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010).

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre quando tripomastigotas metacíclicas eliminadas nas fezes do inseto vetor durante o repasto sanguíneo

penetram na pele através do local da picada ou contaminam as mucosas do hospedeiro vertebrado. As tripomastigotas invadem diferentes tipos celulares (macrófagos, células epiteliais, fibroblastos, células musculares lisas e estriadas) em um processo que envolve o reconhecimento de uma grande variedade de moléculas presentes nas células do parasito e do hospedeiro, dando início ao ciclo intracelular do *T. cruzi*. Após a invasão, as tripomastigotas ficam contidas em uma estrutura conhecida como vacúolo parasitóforo. No interior do vacúolo, as tripomastigotas afiladas e alongadas gradualmente se diferenciam em formas amastigotas arredondadas. Esse processo ocorre paralelamente à lise da membrana do vacúolo parasitóforo por enzimas secretadas pelo parasito, possibilitando então, que as amastigotas, em contato direto com o citoplasma, iniciem seu processo de divisão binária (DE CARVALHO; DE, 1989; DE; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010). Após alguns ciclos de divisão, as amastigotas diferenciam-se novamente em tripomastigotas, que são liberadas após a ruptura da célula hospedeira, alcançando a corrente sanguínea ou invadindo outras células e mantendo a infecção (ANDRADE; ANDREWS, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Estes parasitos circulantes podem então, infectar um novo hospedeiro invertebrado durante seu repasto sanguíneo, fechando o ciclo de vida natural do *T. cruzi* (Figura 1).

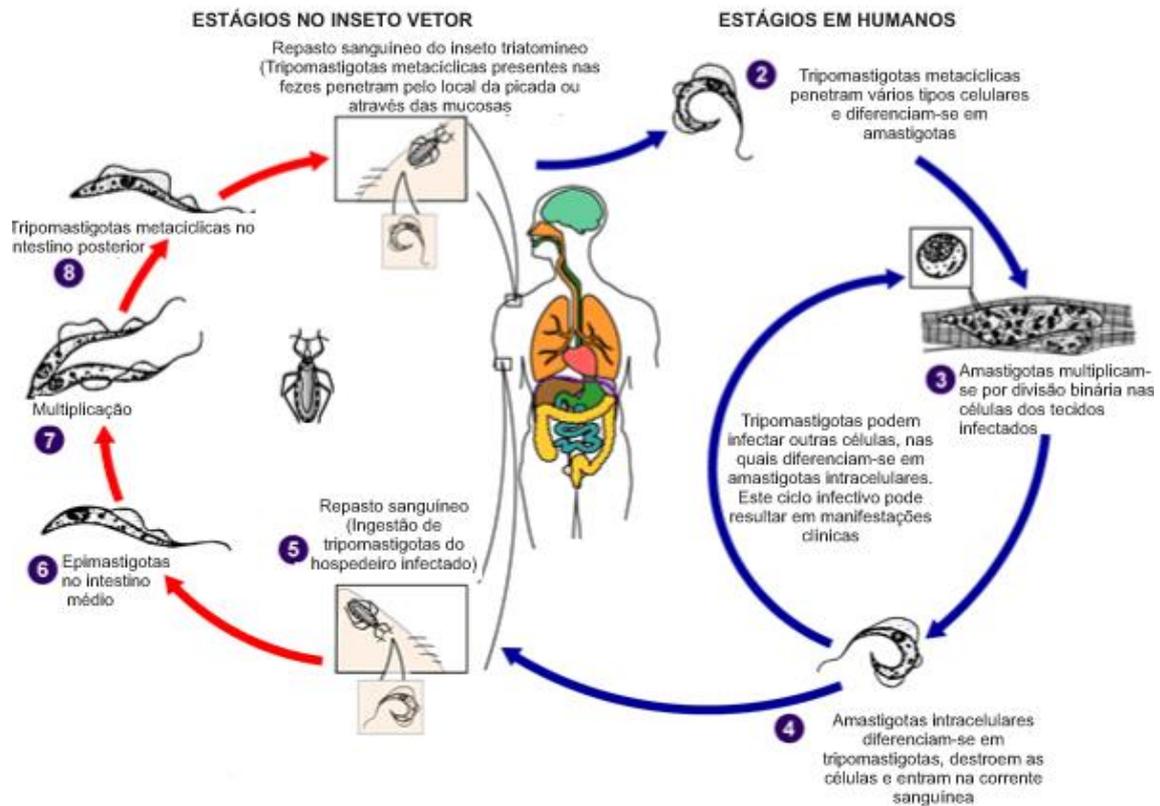


Figura 1: Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC)). Durante o repasto sanguíneo o inseto triatomíneo libera próximo ao local da picada, fezes contaminadas com tripomastigotas. As tripomastigotas penetram o local da infecção ou mucosas do hospedeiro, infectam diferentes tipos celulares e se diferenciam em amastigotas, que constituem a forma replicativa. Após vários ciclos de replicação, as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas que rompem as células infectadas, entram na corrente sanguínea, infectam novas células e tecidos e diferenciam-se novamente em amastigotas. O ciclo tem continuidade quando um novo vetor ingere sangue de um indivíduo infectado com tripomastigotas. No intestino do vetor, estas formas diferenciam-se em epimastigotas, multiplicam-se e finalmente tornam-se tripomastigotas metacíclicas capazes de infectar um novo hospedeiro durante um novo repasto sanguíneo.

1.2. A Doença de Chagas

A doença de Chagas, descoberta em 1909 pelo brasileiro Carlos Chagas, constitui-se como um problema relevante de saúde pública na América Latina (CHAGAS C, 1909; RASSI, Jr.; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Ao longo dos últimos anos, a doença antes acidental, tornou-se endêmica, devido ao desmatamento e ocupação de áreas desmatadas e à adaptação do inseto vetor à habitações humanas (COURA; VINAS, 2010). Além da transmissão vetorial, a doença também

pode ser transmitida de forma congênita, por transfusão sanguínea, por ingestão oral de alimentos contaminados e em acidentes laboratoriais. Nos últimos 20 anos, em países endêmicos, a transmissão vetorial e transfusional da doença foi bastante controlada, graças ao desenvolvimento de programas que visam o controle de vetores e à seleção mais efetiva de doadores de sangue, respectivamente. Entretanto, estimativas atuais da Organização Mundial de Saúde indicam que aproximadamente oito milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo parasito e que cerca de 28 milhões encontram-se em risco de contrair a doença (Figura 2).

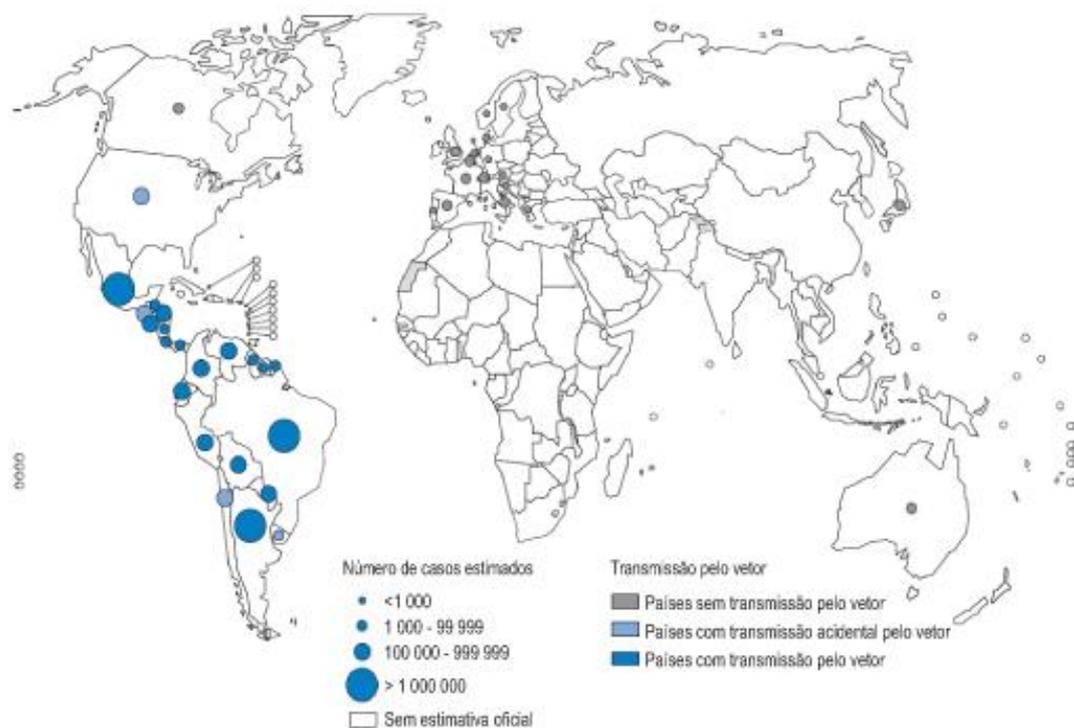


Figura 2: Distribuição dos casos de infecção por *Trypanosoma cruzi* no mundo (Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Além disso, um aumento significativo de pessoas infectadas tem sido detectado em regiões não endêmicas, como América do Norte, Europa, Ásia e Oceania, em decorrência, principalmente, da migração de pessoas provenientes de países endêmicos. Estimativas indicam que cerca de 300 mil pessoas nos Estados

Unidos e 47-67 mil na Espanha, estejam infectadas pelo parasito (COURA; VINAS, 2010; RASSI, Jr.; RASSI; MARIN-NETO, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010) (Figura 3).



Figura 3: Número estimado de pessoas infectadas com *T. cruzi* em países não endêmicos (RASSI, Jr.; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A doença de Chagas se manifesta em duas fases: aguda e crônica. O processo de multiplicação do parasito no hospedeiro vertebrado é responsável pela fase aguda da infecção, que é caracterizada por altos níveis de parasitemia no sangue e parasitismo tecidual. Em humanos essa fase dura aproximadamente dois meses e em geral é assintomática ou marcada por sintomas brandos e pouco específicos, embora aproximadamente 10% dos casos sejam sintomáticos, com desenvolvimento de miocardite grave ou meningoencefalite, resultando em morte.

A maioria das pessoas infectadas (60-70%) não desenvolve a doença, mantendo-se na chamada forma indeterminada da Doença de Chagas, caracterizada por positividade para anticorpos contra *T. cruzi*, normalidade em

eletrocardiogramas e exames radiológicos normais para a região peitoral, esôfago e cólon.

Entre 10 e 30 anos após a infecção inicial, 30-40% dos indivíduos podem desenvolver sintomas clínicos característicos da fase crônica da doença, que incluem problemas cardíacos e/ou digestivos. Em sua forma cardíaca a doença induz destruição e disfunção das células do miocárdio, arritmias ventriculares, inflamação, fibrose e hipertrofia do coração. Na forma digestiva, observa-se uma deservação ao longo de todo o tubo digestivo, que provoca, principalmente no esôfago e cólon distal, descoordenação motora, retenção de alimentos no esôfago e de fezes no reto e colo sigmóide, hipertrofia muscular e, finalmente, dilatação, levando à formação do megaesôfago e do megacólon.

Os danos aos órgãos e tecidos durante a infecção por *T. cruzi* são causados pelo próprio parasito e pela resposta imunoinflamatória do hospedeiro. Após a fase aguda da doença, o número de parasitos é drasticamente reduzido, embora níveis baixos ainda sejam detectados em determinados tecidos ao longo da fase crônica da infecção. Indivíduos imunossuprimidos apresentam aumento da parasitemia e exacerbação do estágio crônico, indicando o papel fundamental da resposta imune do hospedeiro no controle da proliferação e persistência do parasito. Durante a fase crônica da infecção, o balanço entre a resposta imune desencadeada frente ao parasito e os danos provocados pela inflamação no hospedeiro provavelmente determinam o curso da doença. Se a resposta imunológica é ineficiente ou, paradoxalmente, acarreta danos teciduais, tanto a carga parasitária quanto a inflamação tendem a aumentarem. Em contraste, uma resposta imune bem regulada, com baixa carga parasitária e mínimas consequências inflamatórias, resulta em redução no dano tecidual. Embora a patogênese da fase crônica da

doença não seja completamente entendida, diversos trabalhos indicam que a persistência dos parasitos nos tecidos é necessária para o desenvolvimento da doença (RASSI, Jr.; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

O tratamento de escolha para a Doença de Chagas consiste no uso dos compostos tripanocidas Benzonidazol e Nifurtimox. Esses compostos, entretanto, apresentam baixa eficácia, especialmente na fase crônica da infecção, efeitos colaterais consideráveis e precisam ser administrados por longos períodos sob supervisão médica (WILKINSON; KELLY, 2009). Um melhor entendimento sobre a biologia do parasito é fundamental para o desenvolvimento de compostos tripanocidas mais efetivos para o tratamento da Doença de Chagas, que continua sendo um importante problema de saúde pública na América Latina.

1.3. Invasão da célula hospedeira

Os primeiros passos relacionados à interação do *T. cruzi* com a célula hospedeira podem ser divididos em três estágios: adesão e reconhecimento, sinalização e invasão. O processo de adesão envolve o reconhecimento de moléculas presentes na superfície do parasito e da célula hospedeira, desencadeando uma série de processos de sinalização que culminam na invasão da célula pelo parasito (revisado por (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010)).

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* utilizam diferentes mecanismos para invadir as células dos hospedeiros (revisado por CALVET *et al.*, 2012). O mecanismo dependente de lisossomos envolve o aumento, induzido pelo parasito, dos níveis transientes de cálcio citosólico, gerando a despolimerização de filamentos de actina e o recrutamento de lisossomos para o local de entrada do parasito

(HISSA *et al.*, 2012; RODRIGUEZ *et al.*, 1999). A fusão destes lisossomos com o vacúolo em formação resulta no vacúolo parasitóforo, essencial para o desenvolvimento da infecção (ANDREWS, 1994; TOMLINSON *et al.*, 1995). Outro mecanismo de invasão utilizado pelo parasito é o processo de fagocitose, que conta com a participação de filamentos de actina e emissão de pseudópodos pela célula hospedeira. (BARBOSA; MEIRELLES, 1995; FERREIRA *et al.*, 2006; PROCOPIO; BARROS; MORTARA, 1999; ROSESTOLATO *et al.*, 2002). Essa expansão da membrana plasmática culmina com a formação do vacúolo parasitóforo, após a fusão entre endossomos e lisossomos no interior celular. Na via independente de lisossomos, o parasito penetra nas células através de invaginações da membrana plasmática que acumulam fosfatidil-inositol (3,4,5) tri-fosfato (TODOROV *et al.*, 2000; WOOLSEY *et al.*, 2003). Os parasitos internalizados ficam contidos em vacúolos, aos quais ocorre a fusão lisossomal no citoplasma da célula. Essa fusão lisossomal no local de entrada do parasito ou no meio intracelular, após a invaginação da membrana plasmática é importante para o processo infeccioso, pois funciona como um mecanismo de retenção do parasito no interior das células (ANDRADE; ANDREWS, 2004). Posteriormente, as formas tripomastigotas se diferenciam em formas amastigotas e simultaneamente, ocorre a lise da membrana do vacúolo parasitóforo. As amastigotas, em contato direto com o citoplasma, começam a se multiplicar (revisado por (CALVET *et al.*, 2012)) (Figura 4).

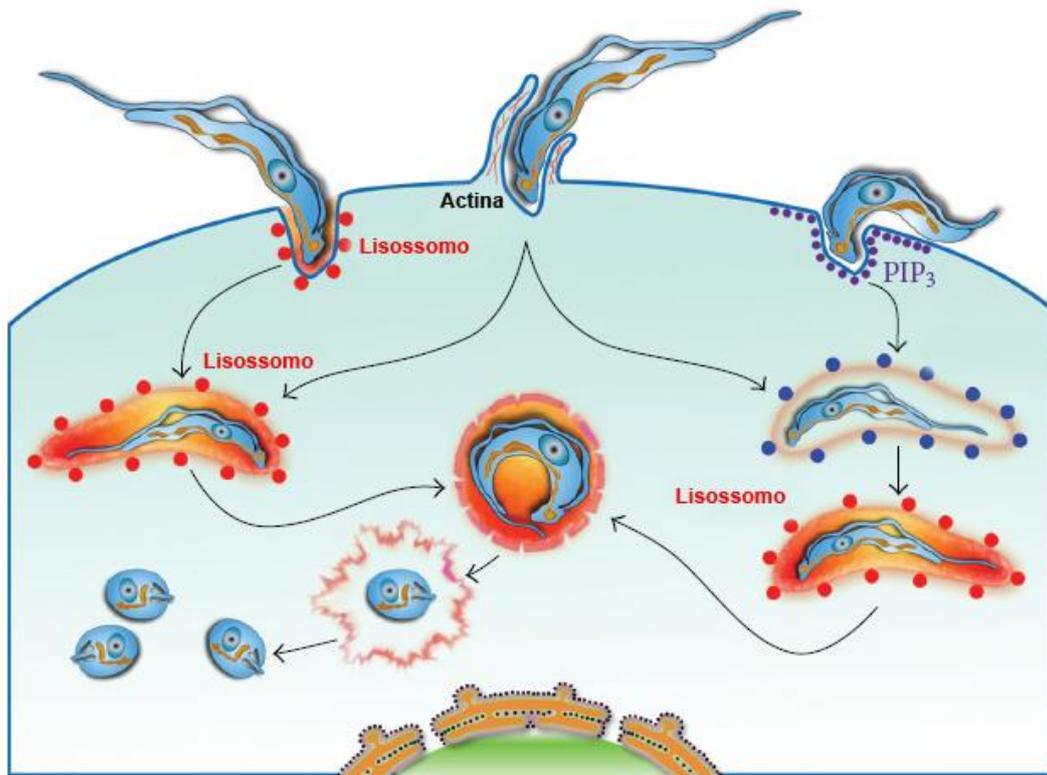


Figura 4: Processo de invasão do *T. cruzi*. Distintos mecanismos de entrada são utilizados para a invasão da célula hospedeira: mecanismo dependente de lisossomos; mecanismo dependente de actina e mecanismo independente de lisossomos. Após a internalização, os parasitos ficam no interior de vacúolos aos quais ocorre a fusão lisossomal. Posteriormente, as tripomastigotas diferenciam-se em amastigotas e evadem o vacúolo para o citoplasma, onde se multiplicam (Adaptado de CALVET *et al.*, 2012).

1.4. O *Trypanosoma cruzi* e o estresse oxidativo

A passagem do parasito pelo hospedeiro vertebrado é um verdadeiro desafio à sua própria sobrevivência. Os macrófagos constituem uma das primeiras linhas de defesa contra a invasão de patógenos intracelulares devido a sua habilidade de reconhecer, fagocitar e destruir microrganismos. Ao penetrar no hospedeiro vertebrado, o *T. cruzi* infecta principalmente essas células fagocíticas, que respondem à invasão produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) como superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pela NADPH oxidase (Nox2), em um processo conhecido como

explosão respiratória (ALVAREZ *et al.*, 2011; CARDONI *et al.*, 1997; KIERSZENBAUM *et al.*, 1974).

As NADPH oxidases constituem complexos enzimáticos transmembrana, que utilizam o NAD(P)H como doador de elétrons para o oxigênio molecular, culminando na geração de ROS. Por muito tempo acreditou-se que a NADPH oxidase fosse exclusiva de células fagocíticas. Entretanto, recentemente seis homólogos desta enzima (gp91^{phox}/Nox2) foram encontrados em outros tipos celulares e denominados: Nox1, Nox3, Nox4, Nox5 (NADPH oxidase 1, 3, 4 e 5), DUOX1 e DUOX2 (dual oxidase 1 e 2). Estes sete complexos constituem agora a família Nox das enzimas NADPH oxidases, diferindo em relação ao tipo celular no qual se encontram, subunidades estruturais, preferências por substratos e tempo de atividade (BEDARD; KRAUSE, 2007; BRANDES; WEISSMANN; SCHRODER, 2014; GRIENGLING; SORESCU; USHIO-FUKAI, 2000).

A NADPH oxidase fagocítica, chamada Nox2, é composta por seis subunidades: duas proteínas transmembrana (p22^{phox} e gp91^{phox}), que formam o flavocitocromo b558 e constituem o sítio catalítico da enzima; três proteínas citoplasmáticas (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}) e uma proteína G regulatória (Rac2). A separação destes dois grupos de componentes em compartimentos distintos garante a regulação do complexo enzimático.

Na presença de um estímulo apropriado, como a fagocitose ou a ligação de padrões moleculares associados a patógenos com receptores do tipo toll, ocorre a ativação da cinase p38 MAPK, via Myd88. Em seguida, a proteína citoplasmática p47^{phox} é fosforilada, expondo o sítio de ligação à p22^{phox}, que se encontra associada à membrana e à gp91^{phox}. O agrupamento destas três subunidades (p22^{phox}, p47^{phox} e gp91^{phox}) permite o recrutamento da p67^{phox} que expõe o sítio de ligação à

gp91^{phox}, após a interação com a Rac2, iniciando a atividade catalítica da enzima (BEDARD; KRAUSE, 2007; LAROUX *et al.*, 2005; LETO, ADAMS; DE MENDEZ, 1994; MIZRAHI *et al.*, 2006) (Figura 5).

A subunidade gp91^{phox} é essencial para a função da NADPH oxidase promovendo a redução do oxigênio por elétrons doados pelo NADPH. Camundongos deficientes na gp91^{phox} ou humanos com mutações neste gene (presente no cromossomo X) apresentam a doença granulomatosa crônica, apresentando infecções recorrentes que podem levar à morte (ASSARI, 2006). Durante a fagocitose, a membrana plasmática é internalizada, formando a parte interna do vacúolo fagocítico. Dessa forma, o O₂^{•-} produzido pela NADPH oxidase é liberado no interior do vacúolo, e a conversão do O₂^{•-} em outras espécies reativas de oxigênio, faz com que o alvo internalizado seja exposto a uma mistura diversa de oxidantes (PANDAY *et al.*, 2015).

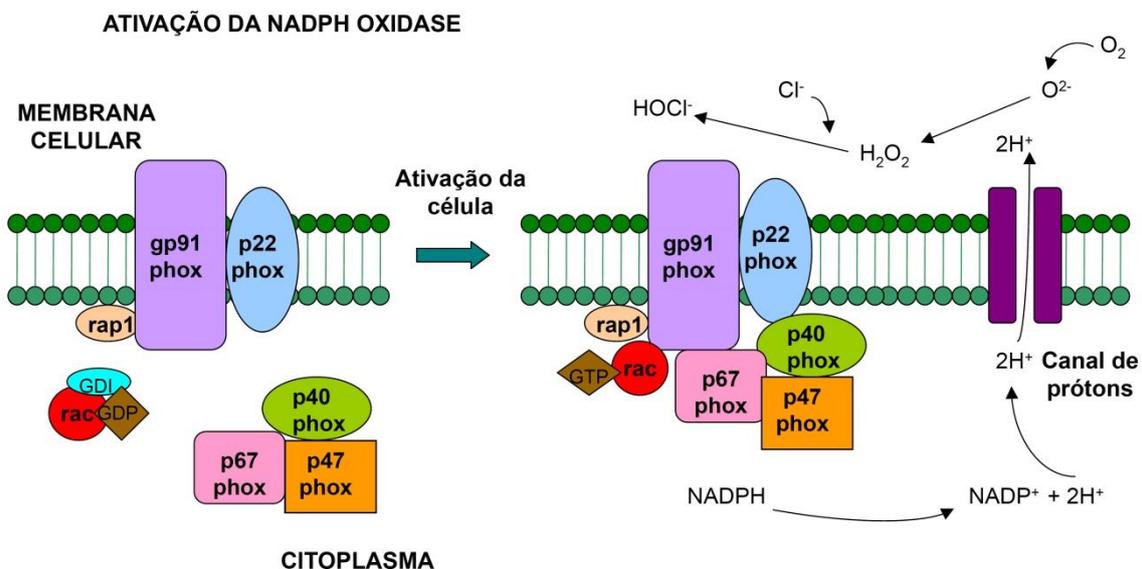


Figura 5: Representação esquemática da enzima NADPH oxidase. O citocromo b558, parte catalítica da enzima conectada à membrana plasmática, é formado por duas subunidades: p22^{phox} e gp91^{phox}. As três subunidades citoplasmáticas (p67^{phox}, p47^{phox} e p40^{phox}) e a proteína Rac ligada à proteína G se deslocam para a membrana após a ativação do complexo NADPH oxidase, responsável pela explosão respiratória. O superóxido pode gerar diversas outras espécies reativas de oxigênio, que juntas, atingem o alvo internalizado (Adaptado de ASSARI, 2006).

A carga aniônica do $O_2^{\bullet-}$ restringe sua difusão através das membranas, confinando suas ações ao local onde ele foi formado. Entretanto, os radicais superóxido podem espontaneamente ou enzimaticamente ser dismutados em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez, possui alta capacidade de difusão. Na presença de H_2O_2 , íons de metais de transição podem gerar o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), um oxidante que por ser altamente reativo, apresenta baixa seletividade contra alvos celulares e não possui alta toxicidade (BABIOR, 1984; GROEMPING; RITTINGER, 2005). Alternativamente, o $O_2^{\bullet-}$ pode reagir com o óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) proveniente da indução da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), produzindo peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), um potente oxidante e agente citotóxico para o *T. cruzi* (ALVAREZ *et al.*, 2004; ALVAREZ *et al.*, 2011; PIACENZA *et al.*, 2008).

Essa reação, entre $^{\bullet}NO$ e $O_2^{\bullet-}$, em pH fisiológico e alta concentração de CO_2 , condições encontradas nos tecidos, pode formar os radicais NO_2^{\bullet} e $CO_3^{\bullet-}$ que causam danos aos microrganismos e também às células do hospedeiro. Em neutrófilos, um mecanismo microbicida importante é a formação do ácido hipocloroso (HOCl) por ação da mieloperoxidase a partir de H_2O_2 .

A detecção de um infiltrado inflamatório composto por neutrófilos e macrófagos em biópsias cardíacas de camundongos (MOLINA *et al.*, 1988) e humanos (MOLINA; KIERSZENBAUM, 1987) infectados sugere que a explosão respiratória das células do sistema imune seja a fonte primária de estresse oxidativo na doença de Chagas. Entretanto, outros estudos demonstraram que a cadeia transportadora de elétrons também se encontra comprometida em corações chagásicos, e a resultante perda de elétrons para o oxigênio molecular contribui para o estresse oxidativo durante o curso da infecção pelo *T. cruzi* (WEN; GARG, 2004;

WEN; GARG, 2008). Além disso, foi demonstrado que cardiomiócitos infectados por *T. cruzi* também apresentam aumento dos níveis de ROS em seus citoplasmas (GUPTA *et al.*, 2009). A infecção pelo parasito afeta o potencial de membrana mitocondrial dos cardiomiócitos, provocando ineficiência na cadeia transportadora de elétrons e culminando com a produção de ROS. Embora a produção de ROS por cardiomiócitos não ocorra como um mecanismo de defesa contra o *T. cruzi*, esses oxidantes também podem induzir danos aos parasitos.

O ciclo deste parasito no hospedeiro invertebrado também constitui outro desafio. No intestino do vetor, os parasitos passam por situações fisiológicas adversas, como alterações no pH, osmolaridade, suprimentos nutricionais, ataque de enzimas digestivas (KOLLIEN; SCHAUB, 2000) e estresse oxidativo, desencadeado pela produção de intermediários de nitrogênio, como o óxido nítrico, produzidos como forma de defesa pelo inseto infectado (WHITTEN *et al.*, 2007).

Neste contexto de geração contínua de mediadores oxidativos pelos hospedeiros, a capacidade do parasito de combater o estresse oxidativo e suas consequências torna-se essencial para a manutenção de sua viabilidade ao longo do seu ciclo de vida.

1.5. Maquinaria antioxidante do *T. cruzi*

Para lidar com a explosão respiratória e se adaptar às condições impostas por seu ciclo de vida digenético, o *T. cruzi* possui uma eficiente e bem regulada maquinaria antioxidante (KRAUTH-SIEGEL; COMINI, 2008; PIACENZA *et al.*, 2009a). A detoxificação de hidroperóxidos pode ser realizada por diversas vias, que diferem na especificidade de substratos e ocorrem em compartimentos distintos,

como a mitocôndria, glicossomo, retículo endoplasmático e citoplasma (FINZI *et al.*, 2004).

Neste sofisticado sistema de vias interligadas, equivalentes redutores do NADPH, produzido pela via das pentoses fosfato, são transferidos para diversas enzimas de detoxificação (peroxidases) através da tripanotiona di-thiol ($T(SH)_2$; *N1,N8-bisglutathionil-spermidina*). A $T(SH)_2$, sintetizada pela tripanotiona sintetase (TS), é mantida em seu estado reduzido pela tripanotiona redutase (TR), uma flavoenzima dependente de NADPH (SHAMES *et al.*, 1986). Cinco peroxidases distintas já foram identificadas em *T. cruzi*: duas glutathion peroxidases (GPX), uma heme-peroxidase dependente de ascorbato (APX) e duas tripanredoxina peroxidases (TXN) (WILKINSON *et al.*, 2000; WILKINSON *et al.*, 2002a; WILKINSON *et al.*, 2002b; WILKINSON *et al.*, 2002d; WILKINSON; MEYER; KELLY, 2000). As TXN diferem em sua localização subcelular, sendo uma forma citosólica e uma mitocondrial (CPX e MPX, respectivamente). Ambas catalisam a redução de H_2O_2 , hidroperóxidos orgânicos de cadeia curta e $ONOO^\bullet$ (FINZI *et al.*, 2004; TRUJILLO *et al.*, 2004; WILKINSON *et al.*, 2000). No retículo endoplasmático, APX e a GPX-II metabolizam o H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos, respectivamente (WILKINSON *et al.*, 2002a; WILKINSON *et al.*, 2002c; WILKINSON *et al.*, 2002d). No citosol e glicossomos, a GPX-I confere resistência aos hidroperóxidos (WILKINSON *et al.*, 2002a) (Figura 6). Além das peroxidases, o *T. cruzi* apresenta ainda um repertório de quatro superóxido dismutases (SOD) que detoxificam o superóxido gerado no citosol (SODB1), glicossomos (SODB1-2) e mitocôndrias (SODA e C). Em contraste com outros eucariotos, os tripanosomatídeos não possuem a enzima catalase, que em mamíferos promove a detoxificação do peróxido de hidrogênio (BOVERIS *et al.*, 1980). Uma vez que as enzimas antioxidantes de *T. cruzi* encontram-se ausentes

em sistemas de mamíferos, os componentes dessa rede de detoxificação de ROS do parasito são considerados bons alvos para o desenvolvimento de quimioterápicos mais seletivos (JAEGER; FLOHE, 2006; KRAUTH-SIEGEL; BAUER; SCHIRMER, 2005).

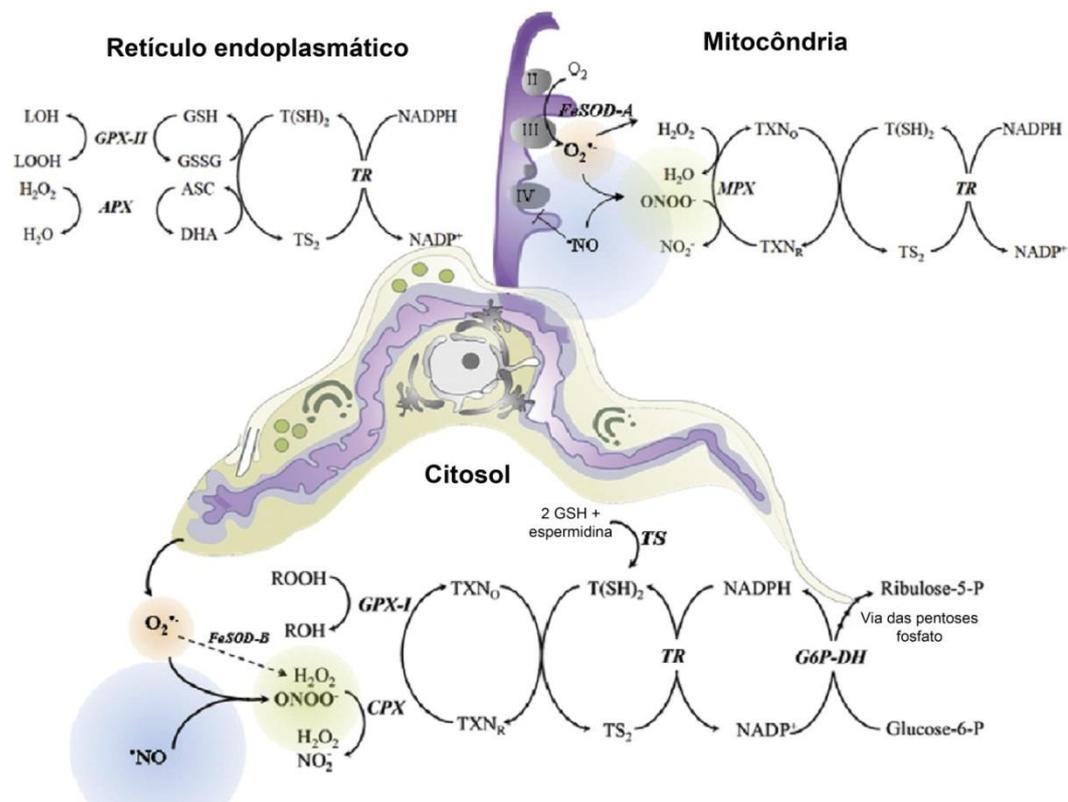


Figura 6: Sistema antioxidante do *T. cruzi*. A rede antioxidante de *T. cruzi* é formada por diversas enzimas distribuídas no retículo endoplasmático, glicossomos, mitocôndria e citoplasma. O doador final de elétrons para todos os sistemas enzimáticos é o NADPH e seus redutores equivalentes são transferidos através da tripanotona ($T(SH)_2$), glutatona (GSH), ascorbato (ASC) e tripanotona (TXN). Retículo endoplasmático: O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é metabolizado por uma hemeperoxidase dependente de ASC (APX), que utiliza o ASC como doador final de elétrons. O deidroascorbato (DHA) resultante é reduzido pela $T(SH)_2$. Na presença de metais de transição, o H_2O_2 pode iniciar reações de lipoperoxidação, resultando na formação de hidroperóxidos orgânicos (LOOH). Os LOOH são substratos da peroxidase dependente de glutatona II (GPX-II) que utiliza a GSH. A $T(SH)_2$ é responsável pela redução da glutatona oxidada (GSSG) para GSH, enquanto que a tripanotona redutase (TR) é responsável pela redução da tripanotona oxidada (TS_2). Mitocôndria: A cadeia transportadora de elétrons é o principal local de formação de superóxido ($O_2^{\bullet-}$), principalmente através do CIII. A superóxido dismutase mitocondrial (FeSOD-A) catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 . Uma vez na mitocôndria, o óxido nítrico (*NO) pode inibir a respiração mitocondrial no CIV, induzindo um aumento na formação de $O_2^{\bullet-}$ pelo CIII. O *NO compete com a Fe-SOD-A pelo $O_2^{\bullet-}$ para formar peroxinitrito ($ONOO^*$). A peroxidase dependente de tripanotona (MPX) decompõe o H_2O_2 e o $ONOO^*$ utilizando a tripanotona reduzida (TXN_R) como substrato redutor. Citoplasma: As enzimas antioxidantes no citoplasma são: peroxidase citosólica (CPX), FeSOD-B, e GPX-I. A $T(SH)_2$ é sintetizada a partir de duas moléculas de GSH e uma espermidina em uma reação catalisada pela enzima tripanotona sintetase (TS). A via das pentoses fosfato (PPP) é responsável pelo fornecimento dos equivalentes redutores do NADPH (PIACENZA *et al.*, 2009a).

Diversas evidências indicam que essa rede antioxidante exerça um papel importante na virulência do parasito e no sucesso da infecção (ALVAREZ *et al.*, 2011; FINZI *et al.*, 2004; PIACENZA *et al.*, 2009b; PIACENZA *et al.*, 2013). Estudos revelaram que parasitos que superexpressam a enzima CPX são altamente resistentes ao ONOO[•] gerado *in vitro* ou liberado para o meio extracelular por macrófagos ativados (ALVAREZ *et al.*, 2011; PIACENZA *et al.*, 2008; WILKINSON *et al.*, 2000). De forma consistente com essas observações, o aumento dos níveis de resistência de parasitos tratados com H₂O₂ também foi correlacionado com o aumento nos níveis de CPX (FINZI *et al.*, 2004). Análises proteômicas mostraram que tripomastigotas metacíclicas infectantes quando comparadas com epimastigotas não infectantes, apresentam expressão aumentada nos níveis das enzimas antioxidantes (TS; MPX; TXN; SODA e APX) (ATWOOD, III *et al.*, 2005; PARODI-TALICE *et al.*, 2007). Além disso, em um estudo realizado com dez cepas de parasitos, mostrou que existe uma associação positiva entre a atividade de enzimas antioxidantes (CPX, MPX e TS) e a virulência dessas cepas durante a fase aguda em infecções experimentais. Os níveis dessas enzimas também se mostraram aumentados durante a diferenciação de formas epimastigotas não infectivas para formas tripomastigotas infectivas em todas as cepas avaliadas (PIACENZA *et al.*, 2009b).

1.6. Reparo de DNA em *T. cruzi*

Apesar de toda essa defesa antioxidante, as condições extremas às quais o parasito é exposto podem submeter seu DNA a várias lesões. Dessa forma, um importante papel pode ser atribuído à maquinaria de reparo de DNA deste parasito,

que mantêm a integridade do seu conteúdo genético durante o processo de invasão e replicação intracelular.

A manutenção da integridade química do DNA diante das lesões desencadeadas por agentes oxidantes é um desafio constante para os organismos vivos. A especificidade do pareamento das bases do DNA, AT e CG, é crucial para se preservar a informação contida no genoma. Entretanto, as bases de DNA são particularmente susceptíveis à oxidação mediada por ROS. O baixo potencial redox da guanina faz com que esta base seja bastante afetada por estes processos de oxidação. A oxidação da guanina resulta principalmente na formação de 7,8-dihidro-8-oxoguanina (ou simplesmente 8-oxoguanina, 8-oxoG), um biomarcador celular de estresse oxidativo (NEELEY; ESSIGMANN, 2006) (Figura 7).

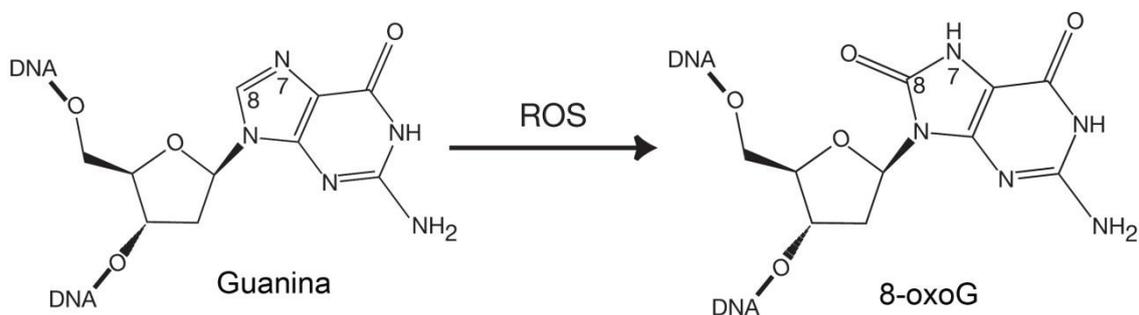


Figura 7: Formação da 8-oxoG através de ROS. Esta base oxidada surge pela introdução de um grupo oxo no carbono na posição 8 (C8) e um átomo hidrogênio no nitrogênio da posição 7 (N7) (Adaptado de HSU *et al.*, 2004)

A 8-oxoG não removida antes da replicação, pode induzir erros nos pareamentos do DNA, podendo se ligar a adenina, quando na posição *syn* ou causando distorções no molde do DNA ao ligar-se a citosina, quando na posição *anti* (CHENG *et al.*, 1992; HSU *et al.*, 2004) (Figura 8)

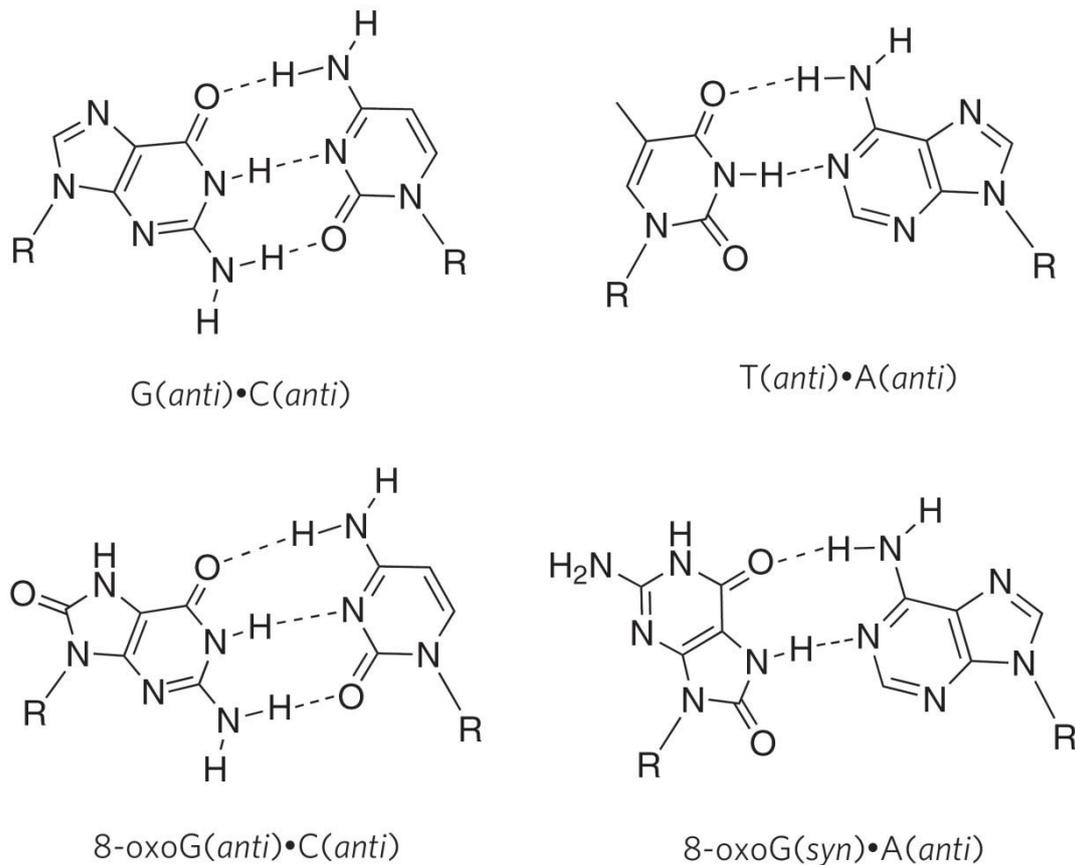


Figura 8: Pareamentos errôneos da 8-oxoG. A 8-oxoG pode se parear com a citosina (C), na posição *anti*; ou com a adenina (A), na posição *syn* (Adaptado de HSU *et al.*, 2004)

As células apresentam diversos mecanismos de reparo para processar as lesões que frequentemente modificam as bases de seu DNA. A via de reparo da 8-oxoG (também conhecida como Sistema GO) é composta pelas enzimas MutM, MutY e MutT em bactérias (MICHAELS; MILLER, 1992) e as correspondentes em eucariotos OGG1, MUTYH e MTH1 (BARNES; LINDAHL, 2004).

Estudos relacionados ao genoma do parasito *T. cruzi* têm demonstrado que este parasito possui homólogos para as enzimas OGG1, MUTYH (EL-SAYED *et al.*, 2005) e MutT (AGUIAR *et al.*, 2013). A glicosilase MutM (OGG1) cliva 8-oxoG do par de bases 8-oxoG:C. Entretanto, se este reparo não for realizado e a replicação acontecer, a glicosilase MutY (MUTYH) remove a adenina erroneamente pareada (8-

oxoG:A). Quando 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato (8-oxo-dGTP) é erroneamente incorporado frente à adenina no molde de DNA, a ação da glicosilase MutY favorece a fixação da transversão AT-CG, pois remove a base correta do par 8-oxoG:A, a adenina. Neste sentido, a enzima MutT tem papel importante na prevenção da incorporação de 8-oxoG através da hidrólise de 8-oxo-dGTP livre no pool de nucleotídeos, formando 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato (8-oxo-dGMP) (BARNES; LINDAHL, 2004) (Figura 9).

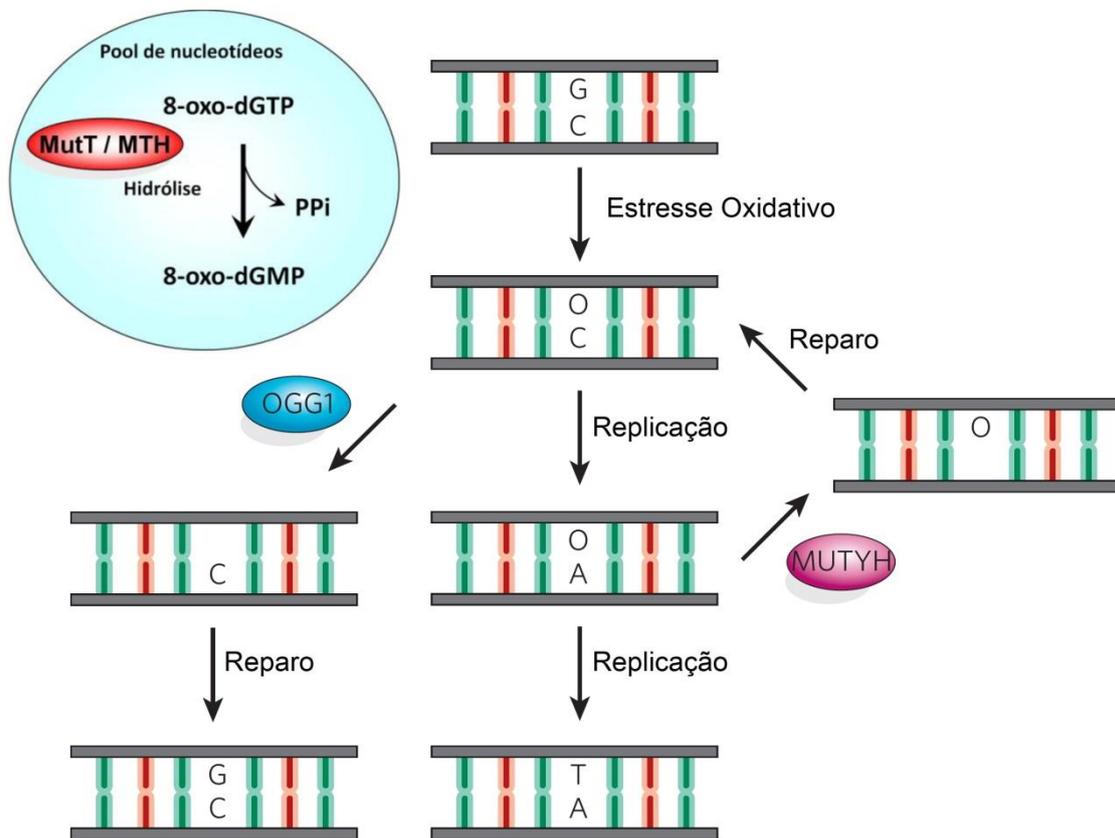


Figura 9: A via de reparo a 8-oxoG. A presença de 8-oxoG no DNA pode causar transversões de G:C para T:A quando não removida do DNA (via central da figura). As glicosilases humanas OGG1 e MUTYH estão envolvidas na excisão de bases do DNA. A enzima MutT tem papel importante na prevenção da incorporação de 8-oxoG através da hidrólise de 8-oxo-dGTP livre no pool de nucleotídeos (Adaptado de DAVID; O'SHEA; KUNDU, 2007)

1.7. O papel de ROS na infecção por *T. cruzi*

Vários trabalhos têm tentando elucidar o papel das ROS durante a infecção por *T. cruzi*, mas os resultados obtidos muitas vezes são contraditórios. Embora alguns estudos tenham sugerido que as ROS produzidas durante a explosão respiratória tenham um papel importante no controle da infecção por *T. cruzi* (ALVAREZ *et al.*, 2011; CARDONI *et al.*, 1997; PIACENZA *et al.*, 2009a; TANAKA; TANOWITZ; BLOOM, 1983), outros autores têm demonstrado que as ROS são importantes para a sinalização e proliferação deste parasito (ANDREWS, 2012; FINZI *et al.*, 2004; NOGUEIRA *et al.*, 2011; PAIVA *et al.*, 2012).

A visão tradicional de que as ROS são importantes na batalha contra patógenos e na redução do crescimento parasitário, tem sido desafiada em estudos realizados com bactérias (JUNG *et al.*, 2013; OBERLEY-DEEGAN *et al.*, 2010), fungos (JIMENEZ-LOPEZ *et al.*, 2013), vírus (FRATERNALE *et al.*, 2009; VLAHOS *et al.*, 2011) e *Leishmania* (MITTRA *et al.*, 2013).

Estudos realizados com o patógeno *Mycobacterium abscessus*, causador de doenças pulmonares, mostraram que essa espécie apresenta um crescimento mais efetivo quando submetida à condições de estresse oxidativo, como o interior de macrófagos. Nesses estudos, o uso de antioxidantes inibiu o crescimento parasitário (OBERLEY-DEEGAN *et al.*, 2010). Outros autores demonstraram que *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis* induzem a produção de NO em macrófagos humanos e que o NO produzido não é capaz de reduzir a carga bacteriana nessas células. Tais dados sugerem que a micobactéria poderia utilizar o NO ou outros produtos oxidantes, como nitrito ou nitrato, para seu benefício (JUNG *et al.*, 2013).

Um estudo realizado com *Candida albicans* demonstrou que em resposta à explosão respiratória gerada por macrófagos após a fagocitose, este parasito induz genes da via biossintética da arginina que induzem o crescimento de hifas dentro de macrófagos (DANTAS *et al.*, 2015; JIMENEZ-LOPEZ *et al.*, 2013).

Estudos realizados com o vírus HIV demonstraram que o uso de antioxidantes pode suprimir a expressão do vírus em células monocíticas cronicamente infectadas e que o aumento dos níveis de GSH intracelular resulta na inibição da replicação do HIV através de vários mecanismos (FRATERNALE *et al.*, 2009). Pesquisadores também demonstraram que a inibição da NADPH oxidase diminui a inflamação pulmonar induzida pelo vírus Influenza A. A ausência ou inibição de Nox2 (animais Phox KO ou tratados com apocinina) provoca uma redução na produção de superóxido por células inflamatórias e nos níveis de peroxinitrito nos pulmões, contribuindo ainda para a eliminação do vírus. Esse trabalho sugere que a modulação da atividade da NADPH oxidase pode representar uma nova abordagem terapêutica para o controle da inflamação pulmonar provocada pelo vírus Influenza A (VLAHOS *et al.*, 2011).

Embora a maioria dos estudos demonstre que as vias antioxidantes observadas em estágios infectivos de *Leishmania* funcionem como um mecanismo de defesa contra a explosão respiratória produzida por macrófagos, um trabalho realizado recentemente demonstrou que as ROS também possuem um papel importante para o desenvolvimento do parasito. Este trabalho mostrou que as ROS são importantes para a diferenciação do parasito de formas promastigotas para formas amastigotas virulentas (MITTRA *et al.*, 2013).

Os mecanismos que determinam a necessidade da atividade da NADPH oxidase para a multiplicação do *T. cruzi* não estão esclarecidos e merecem ser

estudados. Para investigar a contribuição das ROS na infecção por *T. cruzi*, foram utilizados camundongos deficientes da subunidade gp91^{phox} da NADPH oxidase (Phox KO) (POLLOCK *et al.*, 1995) e parasitos resistentes aos danos oxidativos causados no DNA que superexpressam as enzimas EcMutT ou TcMTH (parasitos com o gene *mutT* de *E. coli* e parasitos que superexpressam o gene TcMTH, um homólogo da MutT em *T. cruzi*) (AGUIAR *et al.*, 2013). O estudo da importância das enzimas de reparo de danos oxidativos para a virulência e permanência do parasito no hospedeiro e a avaliação do papel dos mecanismos oxidantes do hospedeiro na infecção pelo *T. cruzi*, podem contribuir para o desenvolvimento de novos compostos tripanocidas mais efetivos para o tratamento da Doença de Chagas, que continua sendo um importante problema de saúde pública na América Latina.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Como o *T. cruzi* apresenta uma maquinaria antioxidante eficientemente regulada para lidar com a explosão respiratória e diversos trabalhos têm demonstrado que as ROS são importantes para o crescimento de diferentes parasitos, nosso objetivo foi determinar se as ROS poderiam favorecer a infecção por *T. cruzi*.

2.2. Objetivos Específicos

- Confirmar se a infecção por *T. cruzi* induz a produção de ROS em macrófagos em nossas condições experimentais.
- Determinar a importância das enzimas de reparo de danos oxidativos no DNA para a virulência e permanência do parasito na célula hospedeira.
- Verificar se a superexpressão de genes relacionados ao reparo de danos oxidativos causados no DNA altera a produção de NO por macrófagos infectados.
- Determinar se a superexpressão das enzimas de reparo de danos oxidativos no DNA afeta o curso da infecção (curva de parasitemia) de camundongos Suíços.
- Verificar se parasitos superexpressores de enzimas relacionadas ao reparo de DNA apresentam alterações na atividade e expressão de suas enzimas antioxidantes.
- Determinar se as ROS derivadas da NADPH oxidase são importantes para o controle ou exacerbação da carga parasitária de macrófagos.
- Determinar se existe produção compensatória de NO em macrófagos deficientes da enzima NADPH oxidase.

- Determinar se a inibição de ROS provenientes de outras fontes além da NADPH oxidase ou se a inibição de ROS específicas (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$) afeta a carga parasitária de macrófagos.
- Verificar se o tratamento com oxidantes (H_2O_2) altera a carga parasitária de macrófagos infectados pelo *T. cruzi*.
- Determinar se as ROS derivadas da NADPH oxidase alteram o curso da infecção de camundongos.

3. Material e Métodos

3.1. Cultivo de parasitos e células

Formas epimastigotas selvagens da cepa CL Brener de *T. cruzi* (TcWT) foram cultivadas a 28°C em meio BHI (*brain heart infusion*). Os parasitos modificados, EcMutT, TcMTH, EcCat, TcROCK, foram obtidos como descrito previamente (AGUIAR *et al.*, 2013). Esses parasitos modificados foram cultivados em meio BHI contendo 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de higromicina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). A utilização desses parasitos foi aprovada pelo Comitê Técnico Nacional de Biossegurança (CTNBio 01200.003883/97-02).

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram obtidas do sobrenadante de culturas de células LLC-MK₂ (células epiteliais de rim de macaco *Rhesus*) infectadas pelo parasito. As células foram cultivadas em frascos de cultura de tecido de 75cm² em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, Brazil), 1% de penicilina/estreptomicina, 3,7mg/L de bicarbonato de sódio (Sigma Aldrich) e 2,0mg/L de HEPES (Sigma Aldrich). Após adesão das células e formação de uma monocamada com aproximadamente 80% de confluência, frascos destinados apenas ao cultivo das células LLC-MK₂ foram lavados com PBS (salina tamponada com fosfato 0,01M, pH 7,3) e submetidos à dissociação química por tripsina/EDTA (0,25%; Gibco, Grand Island, NY, EUA). As células obtidas a partir dessa dissociação foram ressuspensas em meio de cultivo e repassadas para novos frascos. Após uma semana, quando a confluência de 80% foi novamente alcançada, esses frascos foram utilizados para manutenção semanal desse cultivo e para a obtenção dos parasitos.

Para a obtenção dos parasitos as células LLC-MK₂ foram infectadas com 5×10^6 tripomastigotas e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após 48 horas, as células foram lavadas para a remoção dos parasitos extracelulares e o meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Após sete dias de infecção, formas tripomastigotas, liberadas das células infectadas, foram coletadas no sobrenadante e purificadas.

Para a purificação das formas tripomastigotas dos parasitos, os sobrenadantes coletados dos frascos infectados foram transferidos para tubos de centrifuga, centrifugados a 800g, por 10 minutos a 4°C e mantidos por aproximadamente 3 horas em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Esse processo possibilita a migração das tripomastigotas flageladas para o sobrenadante do tubo, separando-as dos restos celulares e eventuais amastigotas, que se mantêm nos sedimentos. Após 3 horas de incubação os sobrenadantes com as tripomastigotas purificadas foram coletados e os parasitos quantificados em câmara de Neubauer e utilizados nos ensaios de infecção.

3.2. Animais

Camundongos C57BL/6 fêmeas ou machos, entre 4 e 8 semanas de idade foram obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, MG, Brasil) e camundongos Phox KO (POLLOCK *et al.*, 1995) e IFN γ ^{-/-} (DALTON *et al.*, 1993) foram adquiridos do “The Jackson Laboratory” (Glesnsville, NJ, EUA, B6.126S6-Cybb^{tm1Din/J} e B6.129S7-Ifng^{tm1Ts/J}, respectivamente). Os animais foram mantidos em biotério convencional, sem restrição de água e comida, tendo ciclos controlados de claro-escuro com intervalos

de 12 horas. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (CETEA 214/11).

3.3. Ensaio de infecção *in vitro*

Os macrófagos utilizados neste estudo foram isolados da cavidade peritoneal de camundongos quatro dias após a injeção de 2ml de tioglicolato 3% (BD, Le Pont de Claix, France), como previamente descrito (REZENDE *et al.*, 2005). As células foram centrifugadas a 300g, por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de penicilina-estreptomicina e 2mM de glutamina. Após serem contadas em câmara de Neubauer, 5×10^5 e 1×10^6 células foram plaqueadas em cada poço das placas de 24 e 96 poços respectivamente e incubadas a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ durante 2 horas. Posteriormente, tripomastigotas de *T. cruzi* purificadas foram adicionadas na proporção 5:1 (parasito/macrófago), e as culturas incubadas por mais 2 horas. Após esse período de infecção, as placas foram lavadas três vezes com PBS para remoção dos parasitos extracelulares e fixadas ou incubadas novamente em meio DMEM por 48 e 72 horas. As lamínulas foram coradas utilizando-se o sistema de coloração hematológica Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). O número de amastigotas e macrófagos infectados foi determinado pela contagem de pelo menos 300 células por amostra. Os resultados foram expressos como índice de infecção (% de células infectadas x N° de amastigotas/N° total de células). As placas de 96 poços foram usadas para contagem de parasitos liberados no sobrenadante dos macrófagos infectados entre 3 e 7 dias após a infecção.

Os seguintes reagentes foram usados nestes ensaios: apocinina (300 μ M; Sigma-Aldrich), N-acetil-cisteína (NAC, 1mM; Sigma-Aldrich), H₂O₂ (100 μ M), superóxido dismutase-polietileno glicol (SOD-PEG, 25 U/poço, Sigma-Aldrich) e catalase polietileno-glicol (CAT-PEG, 40 U/poço, Sigma Aldrich). Os reagentes foram adicionados nas células 30 minutos (H₂O₂) ou 2 horas (apocinina, CAT-PEG, NAC, SOD-PEG) antes e imediatamente depois da infecção. O tratamento dos parasitos foi feito com 100 μ M de H₂O₂ por 30 minutos antes da infecção.

3.4. Dosagem de Nitrito

Macrófagos (5x10⁵) foram acrescentados a placas de cultura de 24 poços e incubados na presença de tripomastigotas de *T. cruzi* (5:1) durante 2 horas. Em seguida, as placas foram lavadas para remoção dos parasitos extracelulares e incubadas novamente em meio de cultura por 48 horas. Após esse período, o sobrenadante foi recolhido e a quantidade de óxido nítrico produzida nas culturas de macrófagos foi estimada a partir da dosagem de nitrito nos sobrenadantes pelo método de Griess. Em cultura, o radical \bullet NO é oxidado a NO₂⁻. As moléculas de NO₂⁻, quando reagem com o Griess, geram uma coloração púrpura cuja intensidade é medida por espectrofotometria (545nm) (GREEN *et al.*, 1982).

Em uma placa de 96 poços foram colocadas as amostras (50 μ L/poço) e o padrão nitrito de sódio (250 μ M), que foi diluído (1:2) nos poços posteriores. Poços em branco consistiam apenas de meio RPMI completo. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de solução de Griess em todos os poços ocupados da placa. A placa foi mantida no escuro por 10 minutos e a densidade óptica foi determinada por

leitura em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer System, modelo SPECTRAmax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

3.5. Detecção de ROS

Para avaliar a produção de ROS por macrófagos em ensaios de luminometria, as células foram obtidas como descrito previamente e ressuspensas em meio RPMI sem vermelho fenol. Um milhão de células foram acrescentadas a cada poço de placas opacas de 96 poços (NUNC, Rochester, NY, USA). As células foram estimuladas com 300µM de apocinina (APO), 1mM de (NAC), 25U de SOD-PEG (SOD) ou 40µg/ml de catalase (CAT) duas horas antes da adição dos parasitos. Em seguida foi adicionado a cada poço 0,05mM de luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona, Sigma-Aldrich) e formas tripomastigotas de *T. cruzi* na proporção 10:1 (parasitos:macrófago). As leituras foram realizadas durante 90 minutos, com intervalos de 2 minutos entre cada uma. A produção de ROS foi expressa como unidades relativas de luz, representada pela intensidade de luz gerada durante a reação entre ROS e luminol.

3.6. Oxidação de DHR (Dihidrorodamina)

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (TcWT, EcMutT e TcMTH) foram tratadas com 200µM de H₂O₂ por 30 minutos. Após esse período de incubação os parasitos foram centrifugados a 1800g por 10 minutos, a 25°C e lavados duas vezes em DPBS (Dulbecco's PBS, pH 7,3; Sigma Aldrich). Os parasitos foram quantificados e a

concentração ajustada para 1×10^9 células/mL. As células foram incubadas por 30 minutos a 28°C em 50µM de DHR (Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR, EUA). Após a incubação as células foram centrifugadas a 1800g por 10 minutos, 25°C e lavadas duas vezes para eliminação do DHR não incorporado. A detecção de RH123 (rodamina 123), produto de oxidação do DHR, foi realizada após exposição das células pré-incubadas com 0,1mM de hidrocloreto de 3-morfolinosidnonimina (SIN-1, Sigma Aldrich), molécula doadora de peroxinitrito. A detecção de RH123 intracelular foi realizada utilizando-se o citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA).

3.7. Detecção de enzimas antioxidantes nos parasitos

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram submetidas a três repiques, três dias consecutivos para manutenção dos parasitos na fase logarítmica de crescimento. Após este processo, as células foram incubadas com H₂O₂ (50µM) por 30 minutos em PBS, lavadas duas vezes e preparadas para determinação das proteínas antioxidantes. Os parasitos (3×10^8 células) foram centrifugados (1800g, 10 minutos, 25°C), lavados três vezes em PBS, ressuspensos em 250µL de tampão de lise (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA e 0.5% (v/v) Triton X-100) e incubados no gelo por 15 minutos. Os extratos celulares foram centrifugados (13,000g, 30 min, 4°C) e os sobrenadantes foram suplementados com tampão de amostra (30 mM Tris-HCl, pH 6.6, 1% (v/v) SDS e 5% (v/v) glicerol) e mantidos a -80°C até o uso.

Para os ensaios de western blot, 50 µg de extratos proteicos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (acrilamida 15%, Tris HCl pH 8,8 0,25M, SDS 0,1%). A eletroforese foi realizada a 300V, 60mA durante 1 hora em

tampão de corrida. Em seguida as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-C extra, GE Healthcare Life Sciences, USA), a 140mA durante 1:30h, em sistema de transferência semi-seca utilizando-se tampão de transferência. Após a transferência, as proteínas foram coradas com solução de Ponceau-S (Aplichem, Daermstadt, Alemanha) para visualização da carga proteica aplicada. Em seguida, a membrana foi bloqueada por incubação com solução de bloqueio (PBS contendo 3% de leite em pó desnatado) sob agitação por 1 hora e posteriormente lavada em PBS 0,1% (v/v) Tween 20 para incubação com os anticorpos. Os anticorpos utilizados foram anticorpos monoclonais de coelho ou camundongo para as principais proteínas da rede antioxidante de *T. cruzi* (PIACENZA et al., 2009b). As membranas foram incubadas com anti-CPX (1:2000) diluído em PBS contendo 0,1% (v/v) Tween 20 durante 1 hora, 25°C sob agitação. Após três ciclos de lavagem de 10 minutos com PBS 0,1% (v/v) de Tween 20 sob agitação, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho IRE-800 (LI-COR, Lincoln, NE, USA), na proporção 1:10000 em PBS contendo 0,1% (v/v) de Tween 20 durante 1 hora, no escuro, sob agitação. Após incubação com o anticorpo conjugado as membranas foram submetidas a dois ciclos de lavagem de 5 minutos e digitalizadas utilizando-se o aparelho LI-COR Odyssey Infrared Imaging System. O conteúdo de proteínas em relação à carga total de proteínas aplicada em diferentes extratos (Ponceau-S staining, MOORE; VISELLI, 2000) foi determinado por técnicas de densitometria utilizando-se o programa Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA). Os resultados são expressos como quantidade de enzimas em relação ao conteúdo total de proteínas (PIACENZA et al., 2009b).

Para determinar a quantidade de MPX, SODB, e cruzipaina os parasitos foram fixados em paraformaldeído (4%) e incubados com anti-MPX, anti-SODB, e

anti-cruzipaina (1:2000) por 1 hora a 37°C sob agitação. Em seguida os parasitos foram lavados em PBS e incubados com anti-IgG de coelho conjugado com fluoróforo Alexa 488 (Life Technologies, Eugene, OR, EUA) (1:10000) durante 1 hora. Os parasitos foram lavados novamente, ressuspensos em PBS e analisados por citometria de fluxo (FACS-Calibur).

3.8. Detecção de 8-oxoG

Recentemente foi demonstrado que a estreptavidina pode se ligar de forma altamente específica com a 8-oxoG (GAD *et al.*, 2014; STRUTHERS *et al.*, 1998a). Para se detectar a quantidade de 8-oxodG presente nos parasitos, epimastigotas de *T. cruzi* foram tratadas com H₂O₂ por 30 minutos, fixadas em paraformaldeído a 2% durante 15 minutos a 25°C e incubadas em PBS com 0,1% Triton X-100. As células foram então incubadas com estreptavidina conjugada com Alexa 488 (Invitrogen) na proporção de 1:100 em PBS por 1 h a 37°C e analisadas por citometria de fluxo (FACS-Calibur).

3.9. Experimentos de infecção *in vivo*

Os experimentos de infecção *in vivo* foram realizados com tripomastigotas sanguíneas, mantidas por passagens simultâneas em camundongos IFN- γ ^{-/-} a cada sete dias. Os parasitos foram obtidos de sangue heparinizado, contados e utilizados para infecção dos grupos experimentais. A infecção experimental foi realizada em camundongos C57BL/6 WT e Phox KO através de injeção intraperitoneal de um milhão de tripomastigotas sanguíneos (TcWT ou TcMTH). Camundongos Suíços

também foram infectados com 2 milhões de parasitos (TcWT, TcROCK ou EcMutT). Cada grupo foi composto por 5 animais. A parasitemia foi avaliada através da contagem das tripomastigotas em 5 μ L de sangue da veia caudal dos animais infectados. As contagens foram realizadas a partir do 3^o dia de infecção, todos os dias, até a parasitemia se tornar indetectável. O número de parasitos por mL de sangue foi calculado conforme descrito previamente (BRENER, 1962). A mortalidade dos animais infectados foi monitorada diariamente.

3.10. Análise Experimental

Os experimentos de infecção *in vitro*, foram analisados pelo teste one-way ANOVA, ou avaliados pelo two-way ANOVA com o teste de comparação múltipla de Bonferroni, para comparação individual entre os grupos. Diferenças entre dois grupos foram comparadas por teste *t* de Student para amostras não pareadas. Todas as análises estatísticas deste trabalho foram realizadas no programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. O parasito *T. cruzi* induz a produção de ROS por macrófagos

A internalização de formas tripomastigotas de *T. cruzi* por macrófagos resulta na ativação da NADPH oxidase e na consequente produção de espécies reativas de oxigênio (ALVAREZ *et al.*, 2011; BERGERON *et al.*, 2008; PAIVA *et al.*, 2012). Para confirmar que a infecção de macrófagos por *T. cruzi* induz a explosão respiratória em nosso modelo experimental, foram realizados experimentos de quimiluminescência utilizando-se luminol, uma sonda capaz de detectar $O_2^{\bullet-}$, e $ONOO^{\bullet}$ (ALVAREZ *et al.*, 2011). A infecção aumentou a quimiluminescência e a produção de ROS desencadeada pelos parasitos foi quase três vezes maior do que a produção observada em células não infectadas. Como esperado, não foi detectada quimiluminescência em macrófagos Phox KO infectados por *T. cruzi* ou tratados com zimozan. Da mesma forma, como previamente publicado (PAIVA *et al.*, 2012), o pré-tratamento de macrófagos com apocinina, composto que inibe a translocação da subunidade $p47^{phox}$ e consequentemente inibe a ativação da NADPH oxidase, também diminuiu a produção de ROS desencadeada pela infecção. O tratamento de macrófagos com SOD-PEG, NAC e catalase, mostrou que estes são antioxidantes eficientes, capazes de reduzir a intensidade de luminescência da sonda utilizada (Figura 10). Uma vez confirmada a produção de ROS por macrófagos infectados com *T. cruzi*, outros experimentos foram conduzidos a fim de se verificar o papel dessas moléculas durante o curso da infecção por este parasito.

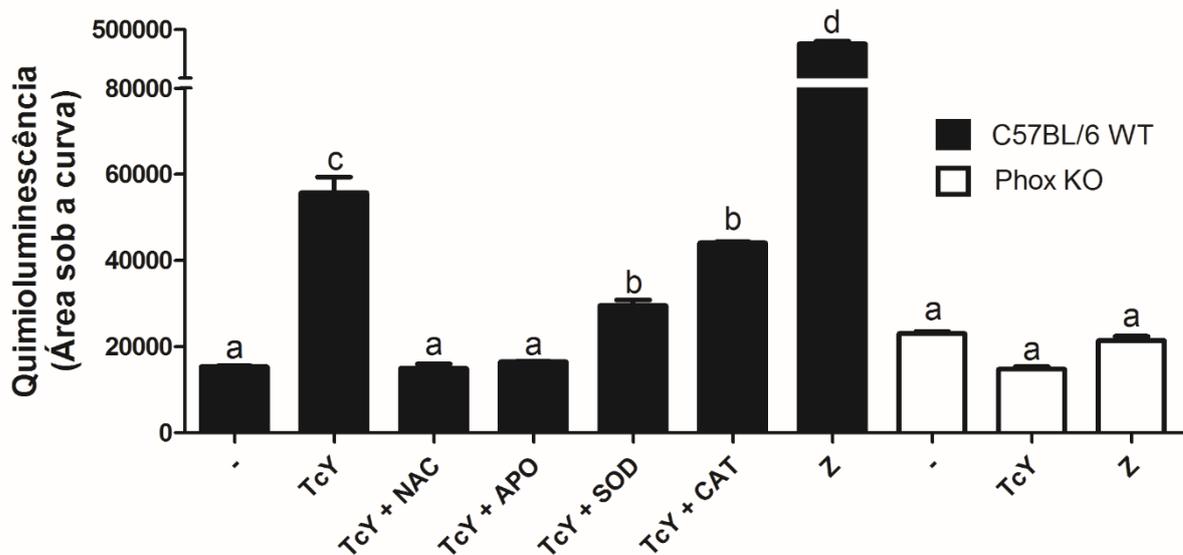


Figura 10: Produção de ROS por macrófagos estimulados com *T. cruzi*. Macrófagos inflamatórios foram retirados da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 WT e Phox KO quatro dias após estímulo com tioglicolato. Macrófagos foram incubados com 0,5mM de luminol em meio de cultura e expostos a tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* (TcY), apocinina (APO), superóxido dismutase (SOD), N-acetil-cisteína (NAC), catalase (CAT) e zimozan (Z). A quimiluminescência foi medida continuamente, imediatamente após a adição de *T. cruzi* aos poços nos quais as células foram plaqueadas. Os dados representam a média \pm SD do total de medidas em 90 minutos. Letras diferentes (a,b,d) representam diferenças estatísticas entre as barras ($p < 0,05$). O gráfico apresentado é representativo de três experimentos independentes.

4.2. Parasitos com atividade 8-oxo-dGTPase aumentada apresentam maior multiplicação em culturas de macrófagos

Parasitos da cepa CL Brener foram geneticamente modificados para superexpressarem o gene MutT de *E. coli* (EcMutT) e seu ortólogo em *T. cruzi*, TcMTH (AGUIAR *et al.*, 2013). A enzima MutT de *E. coli* é uma 8-oxo-dGTPase, que hidrolisa 8-oxo-dGTP livre no pool de nucleotídeos a 8-oxo-dGMP, impedindo assim a incorporação de nucleotídeos oxidados no DNA. Para melhor compreender a importância de enzimas de reparo em *T. cruzi*, parasitos resistentes, EcMutT e TcMTH, foram utilizados em ensaios de infecção de macrófagos. Após duas horas

de infecção, as células foram lavadas para remoção dos parasitos extracelulares e fixadas ou incubadas novamente em meio de cultura por até 72 horas.

O processo de invasão celular por *T. cruzi* foi avaliado duas horas após a infecção. A modificação genética não alterou a capacidade de infecção destes parasitos, que apresentaram o mesmo índice de infecção (Figura 11A).

A capacidade replicativa destes parasitos foi investigada 48 e 72 horas após a infecção. Não foram observadas diferenças significativas entre os parasitos TcWT e os parasitos TcROCK, transfectados com o plasmídeo vazio. O índice de infecção de macrófagos infectados com os parasitos EcMutT e TcMTH foi maior do que aquele encontrado para macrófagos infectados com TcWT e TcROCK. Essa diferença foi ainda mais acentuada após 72 horas de infecção, mostrando que estes parasitos apresentam maior capacidade replicativa do que aqueles não modificados (Figura 11A). Esse resultado foi corroborado pela contagem de tripomastigotas liberadas no sobrenadante de células infectadas. O número de parasitos EcMutT liberados no sobrenadante de macrófagos infectados foi maior do que o número de parasitos TcWT. Além disso, a liberação de parasitos EcMutT ocorre antes da liberação de parasitos TcWT, reforçando os resultados que indicam que os parasitos modificados apresentam maior capacidade de multiplicação (Figura 11B). Esses dados indicam que a remoção de 8-oxo-dGTP do pool de nucleotídeos aumenta o sucesso da infecção por *T. cruzi* em macrófagos murinos.

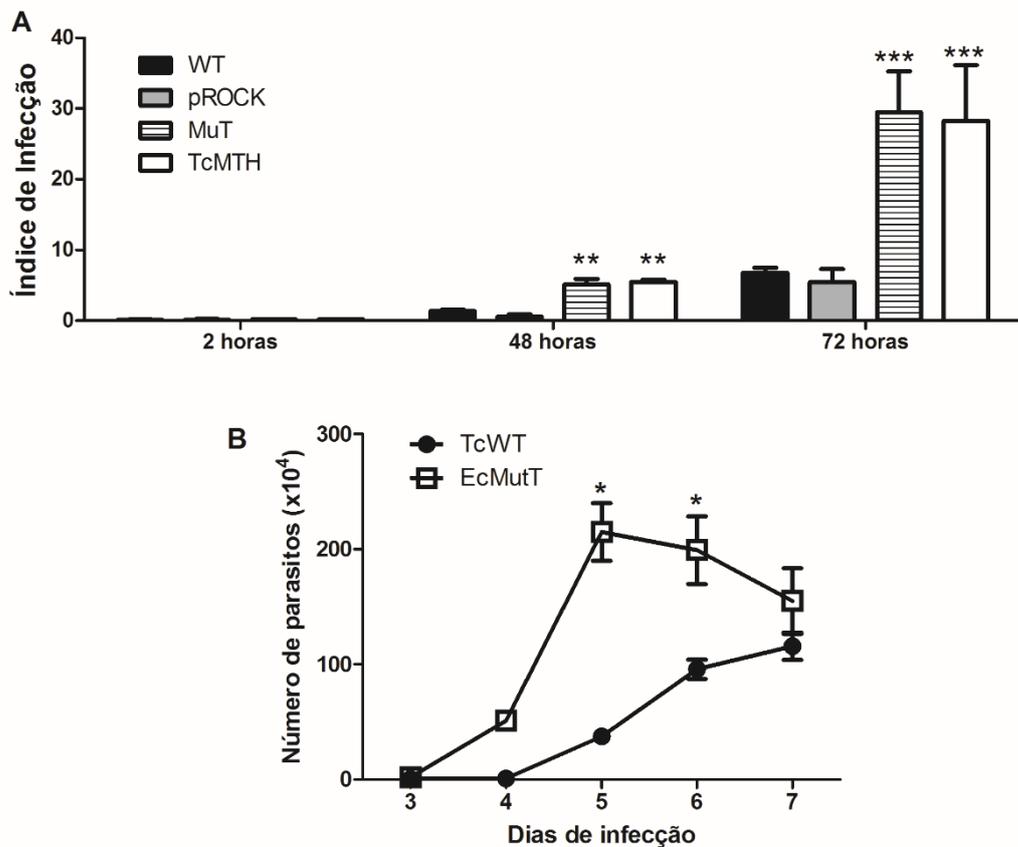


Figura 11: Parasitos transfectados com genes relacionados ao reparo de DNA apresentam maior capacidade replicativa. Macrófagos inflamatórios obtidos da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 WT quatro dias após o estímulo com tioglicolato, foram infectados com parasitos selvagens e modificados. Após a infecção as células foram lavadas para remoção dos parasitos extracelulares e fixadas ou incubadas novamente em meio de cultivo por até 72 horas. (A) Índice de infecção de macrófagos infectados com diferentes populações da cepa CL Brener de *T. cruzi*. O índice de infecção é uma relação entre o número de macrófagos infectados (MI) e amastigotas (A) pelo número total de macrófagos (MT) $[(A \times MI/MT)]$. (B) Número de parasitos liberados no sobrenadante de macrófagos entre três e sete dias após a infecção. Os gráficos representam um de um total de três experimentos; * indicam diferenças significativas entre os grupos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.3. Modulação da produção de óxido nítrico por *T. cruzi*

Dados publicados previamente demonstraram que a infecção por *T. cruzi*, por si, não induz a produção de óxido nítrico (BERGERON; OLIVIER, 2006). Para verificar se o mesmo fenômeno acontece em nosso sistema experimental, macrófagos foram infectados com diferentes populações de parasitos e a produção

de óxido nítrico foi avaliada pelo método de Griess. Como esperado, a infecção com *T. cruzi* não induziu a produção de NO nessas células. Após 48 horas de infecção não foram detectados níveis significativos de NO independente da população de parasitos utilizada (Figura 12).

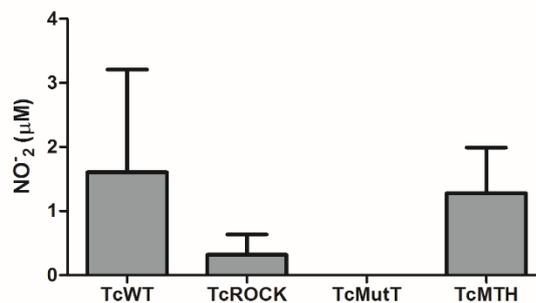


Figura 12: Produção de NO por macrófagos infectados com diferentes populações da cepa CL Brener de *T. cruzi* após 48 horas. Macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 WT 4 dias após o estímulo com tioglicolato foram infectados com parasitos selvagens e modificados. Duas horas após a infecção, as células foram lavadas para remoção dos parasitos extracelulares e incubadas novamente em meio de cultivo por 48 horas. A produção de NO por macrófagos foi quantificada pelo método de Griess.

4.4. Avaliação da multiplicação de parasitos resistentes ao estresse oxidativo

in vivo

Para avaliar o perfil de infecção dos parasitos TcWT, TcROCK e EcMutT *in vivo*, camundongos Suíços foram infectados por via intraperitoneal com 2×10^6 tripomastigotas de cultura. A parasitemia destes animais foi avaliada até o 11^o dia após a infecção, quando tripomastigotas sanguíneas não foram mais detectadas. Diferenças significativas não foram observadas na parasitemia de camundongos infectados com TcWT ou TcROCK, mostrando que essas populações apresentam o mesmo perfil de infecção *in vivo*. A população EcMutT, por sua vez, apresentou níveis de parasitemia significativamente mais elevados do que as populações TcWT e TcROCK (Figura 13). Tais resultados corroboram aqueles obtidos com macrófagos

infectados, indicando que a superexpressão de MutT favorece o crescimento dos parasitos no interior das células.

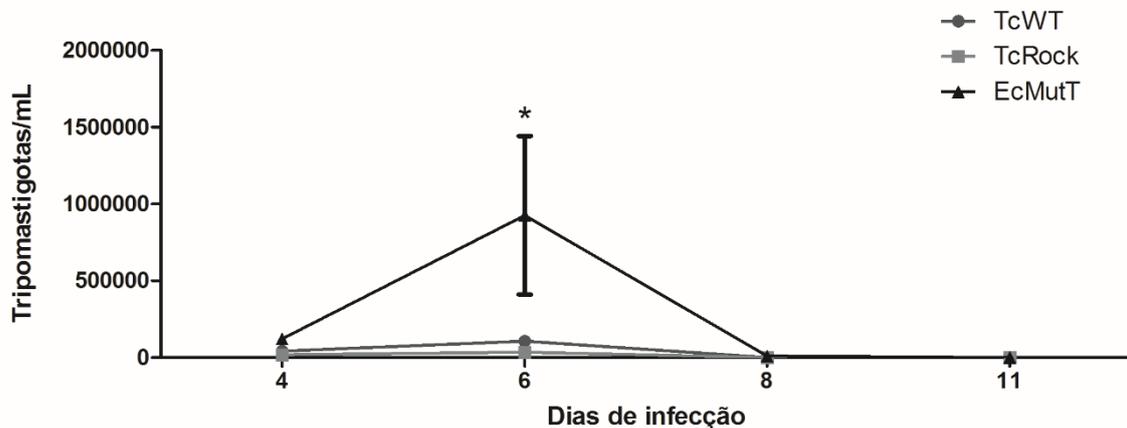


Figura 13: Parasitos transfectados com o gene MutT de *E. coli* apresentam níveis de parasitemia elevados. Camundongos Suíços foram infectados com 2×10^6 parasitos e a parasitemia acompanhada a cada dois dias. ** $p < 0,01$

4.5. Oxidação de DHR e expressão de enzimas antioxidantes

As peroxirredoxinas são enzimas antioxidantes que exercem um papel importante na metabolização do peroxinitrito, minimizando a formação de radicais derivados dessa molécula, como $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3^{\bullet-}$ (TRUJILLO et al., 2004). Para determinar se os parasitos EcMutT e TcMTH apresentam níveis reduzidos de radicais derivados do peroxinitrito, epimastigotas foram carregadas com a sonda DHR e então desafiadas com peroxinitrito (proveniente do doador SIN-1). A sonda DHR se acumula nas células e quando oxidada por ROS ou peroxinitrito, origina a substância fluorescente RH123. A oxidação dessa sonda e a formação de RH123 em epimastigotas indica que oxidantes extracelulares alcançaram o citoplasma dos parasitos (ALVAREZ et al., 2004). Dessa forma, é possível relacionar a oxidação da

sonda DHR à atividade das enzimas antioxidantes. Quanto menor a oxidação dessa sonda, maior a metabolização do peroxinitrito, possivelmente devido a maior atividade de enzimas antioxidantes.

Os parasitos modificados apresentaram menor oxidação do DHR intracelular quando comparados aos parasitos controle. A maior oxidação de DHR foi observada em parasitos controle pré-tratados com H₂O₂. A oxidação de DHR não foi aumentada quando parasitos EcMutT e TcMTH foram pré-tratados com H₂O₂ e posteriormente desafiados com peroxinitrito (Figura 14A). Esses resultados indicam que os parasitos modificados apresentam maior atividade de suas enzimas antioxidantes em relação aos parasitos controle.

Em seguida a expressão de enzimas relacionadas ao sistema antioxidante de *T. cruzi* foi avaliada nesses parasitos. O pré-condicionamento dos parasitos com H₂O₂ não promoveu aumento na expressão de CPX (Figura 14B), mas aumentou a expressão da MPX (Figura 14C e AGUIAR *et al.*, 2013) tanto em TcWT quando em TcMTH. Corroborando os resultados obtidos nos experimentos de oxidação de DHR, os parasitos modificados superexpressaram ambas as enzimas, CPX e MPX. A expressão da enzima SODB, por sua vez, foi similar entre os parasitos controle e modificados, além de não ter sido alterada após o pré-tratamento das células com H₂O₂ (Figura 14D). Conforme esperado, a expressão da enzima cruzipaína, utilizada como controle do experimento, não diferiu entre os grupos (Figura 14E).

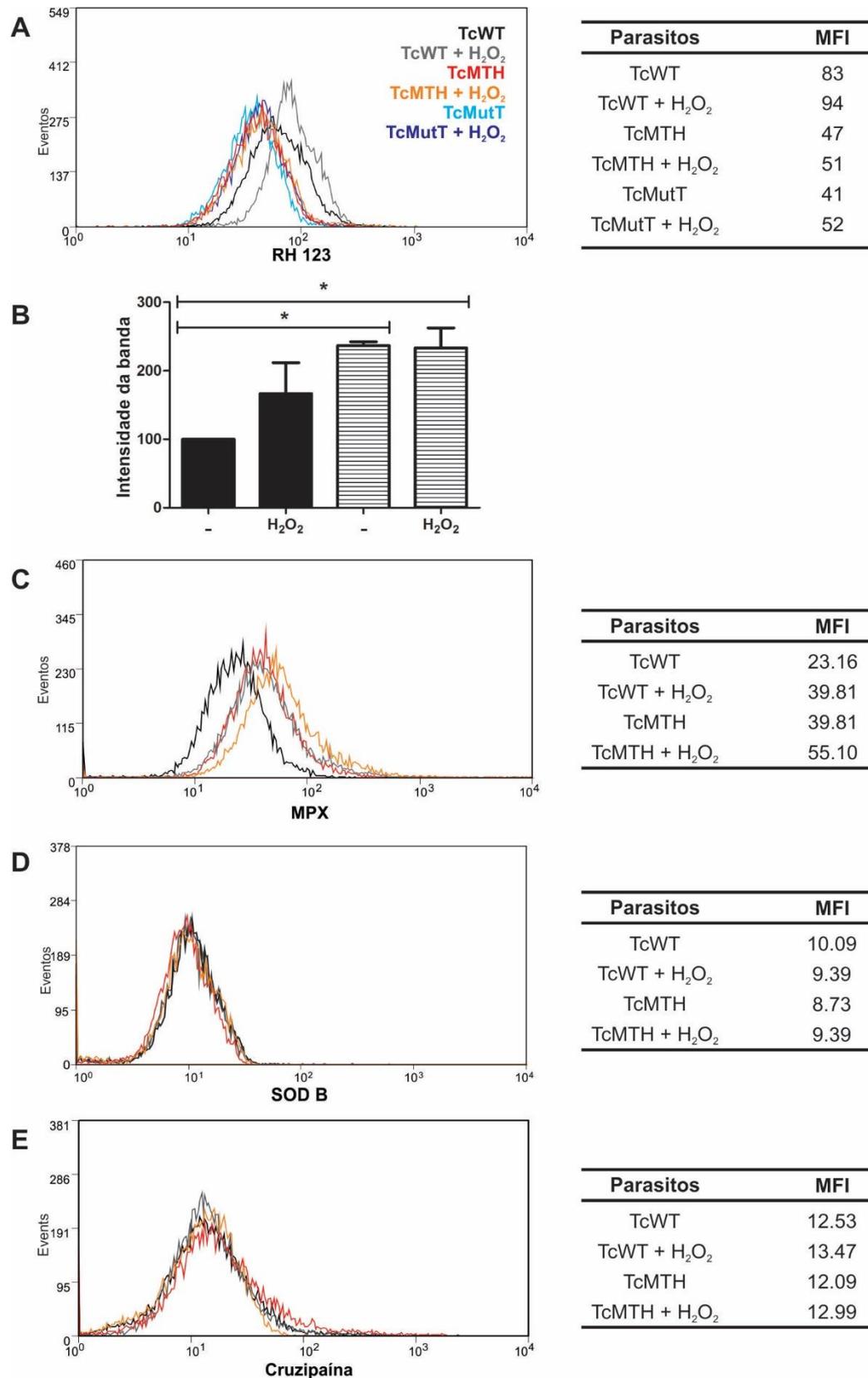


Figura 14: Análise da oxidação intracelular de DHR e expressão de enzimas antioxidantes em *T. cruzi*. 1×10^9 epimastigotas de *T. cruzi* (TcWT, EcMutT e TcMTH) foram tratadas com $200 \mu\text{M}$ de H_2O_2 por 30 minutos. (A) Os parasitos foram previamente incubados com DHR ($50 \mu\text{M}$) e expostos ao doador de peroxinitrito hidrocloreto de 3-morfolinossidnonimina (SIN-1, $0,1 \text{mM}$). A formação de RH123

foi avaliada por citometria de fluxo. Os histogramas e a tabela com valores das medianas de intensidade de fluorescência (MFI) são representativos de um experimento representativo. (B) Análise da expressão da enzima CPX por Western Blot em extratos de parasitos utilizando-se um anticorpo anti-CPX específico. Os resultados de três experimentos foram expressos como densidade de bandas no Western Blot. Análise da expressão de MPX (C), SODB (D) e cruzipaina (E) utilizando-se anticorpos anti-MPX, anti-SODB e anti-cruzipaina específicos, por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como histogramas e tabelas com valores das MFI. Os gráficos são representativos de três experimentos diferentes. O símbolo asterisco (*) indica diferenças significativas entre as barras destacadas, $p < 0,05$.

4.6. As enzimas MTH e MutT previnem a incorporação de 8-oxo-dGTP no DNA de parasitos modificados

Resultados obtidos anteriormente demonstraram que parasitos EcMutT apresentam menos lesões no seu DNA nuclear quando comparados com parasitos TcROCK (AGUIAR *et al.*, 2013). Então avaliamos o acúmulo de 8-oxodG no DNA desses parasitos após a exposição das células a H_2O_2 .

A avidina é uma proteína presente na clara do ovo que apresenta forte afinidade para a vitamina biotina. Seu análogo bacteriano, estreptavidina apresenta afinidade similar. A base guanina apresenta pouca relação estrutural com a molécula biotina, mas as formas 8-oxodeoxiguanina e 8-oxodeoxiguanosina, produtos de danos oxidativos no DNA, apresentam grande similaridade estrutural com a biotina (STRUTHERS *et al.*, 1998b). Dessa forma, a detecção da base modificada 8-oxodG foi realizada por citometria de fluxo, utilizando-se estreptavidina conjugada com Alexa-488.

Após o tratamento de epimastigotas com H_2O_2 , foi observado um aumento de 8-oxodG no DNA dos parasitos controle, TcWT. Epimastigotas de parasitos EcMutT não apresentaram níveis de 8-oxodG aumentados em seu DNA após o tratamento com H_2O_2 (Figura 15 A). Esses resultados ressaltam a atividade da enzima MutT nos parasitos modificados, indicando que essa enzima cumpre sua

função na hidrólise da base guanina modificada pelo estresse oxidativo, minimizando sua incorporação e consequentes lesões no DNA.

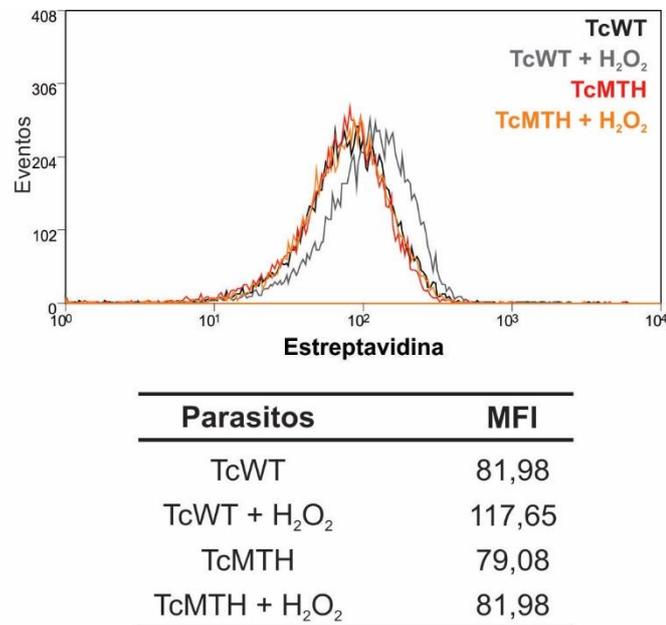


Figura 15: As enzimas MTH e MutT previnem a incorporação de 8-oxo-dGTP. (A) Epimastigotas foram tratadas com 200 μ M de H₂O₂ por 30 minutos, fixadas e a incorporação de 8-oxoG no DNA foi avaliada utilizando-se estreptavidina conjugada com Alexa Fluor 588 por citometria de fluxo. O histograma e a tabela com valores da MFI são representativos de três experimentos independentes.

4.7. Macrófagos Phox KO apresentam parasitismo reduzido

Os resultados apresentados mostraram que a infecção por *T. cruzi* resulta na produção de ROS por macrófagos. Esse estresse oxidativo desencadeado durante a infecção poderia ser utilizado para limitar o crescimento dos parasitos causando, por exemplo, danos em seu DNA. Uma maquinaria de reparo capaz de corrigir danos desencadeados pelo estresse oxidativo poderia contribuir para uma replicação mais efetiva, mesmo em condições de estresse. Nossos resultados

também demonstraram que a superexpressão de genes relacionados ao reparo de DNA favorece o crescimento dos parasitos *in vitro* e *in vivo*.

Para avaliar melhor o papel das espécies reativas de oxigênio na infecção por *T. cruzi*, macrófagos de camundongos Phox KO foram utilizados nos ensaios experimentais. Esses animais são nocautes para a subunidade catalítica gp91^{phox} da NADPH oxidase e conseqüentemente, quando infectados, produzem menos ROS do que camundongos C57BL/6 WT (Figura 10).

Macrófagos Phox KO e C57BL/6 WT apresentaram a mesma capacidade de internalização de parasitos, uma vez que não foram encontradas diferenças em relação ao parasitismo dessas células após duas horas de infecção. Entretanto, após 48 horas, macrófagos Phox KO infectados com a cepa Y de *T. cruzi* apresentaram parasitismo reduzido em comparação aos macrófagos C57BL/6 WT infectados (Figura 16A).

O número de tripomastigotas liberadas no sobrenadante de macrófagos infectados também foi avaliado. Macrófagos foram plaqueados, infectados e mantidos em estufa de CO₂ 5% a 37°C por sete dias para se avaliar a quantidade de tripomastigotas liberadas no sobrenadante das culturas. Os resultados obtidos condizem com os resultados de replicação de amastigotas e mostram que após sete dias de infecção há um grande número de tripomastigotas no sobrenadante de macrófagos C57BL/6 e um número reduzido de parasitos no sobrenadante de células Phox KO (Figura 16B).

A fim de se verificar se estes resultados eram relacionados apenas a uma cepa específica de *T. cruzi*, no caso a cepa Y, realizamos os mesmos experimentos utilizando-se a cepa CL Brener. Os resultados obtidos com esta cepa foram similares àqueles obtidos com a cepa Y, mostrando que a multiplicação do parasito em

macrófagos Phox KO é menor em relação à multiplicação dos parasitos em macrófagos C57BL/6 WT (Figura 16C). Da mesma forma, em macrófagos C57BL/6 WT observou-se um número maior e progressivo de tripomastigotas liberadas no sobrenadante das culturas entre os 3^o e 7^o dia de infecção, quando comparados com macrófagos Phox KO (Figura 16D).

Esses resultados indicam que os parasitos que infectam os macrófagos de camundongos C57BL/6 WT são suficientemente capazes de se replicar, enquanto que em macrófagos deficientes na produção de ROS, os parasitos não se multiplicam devidamente.

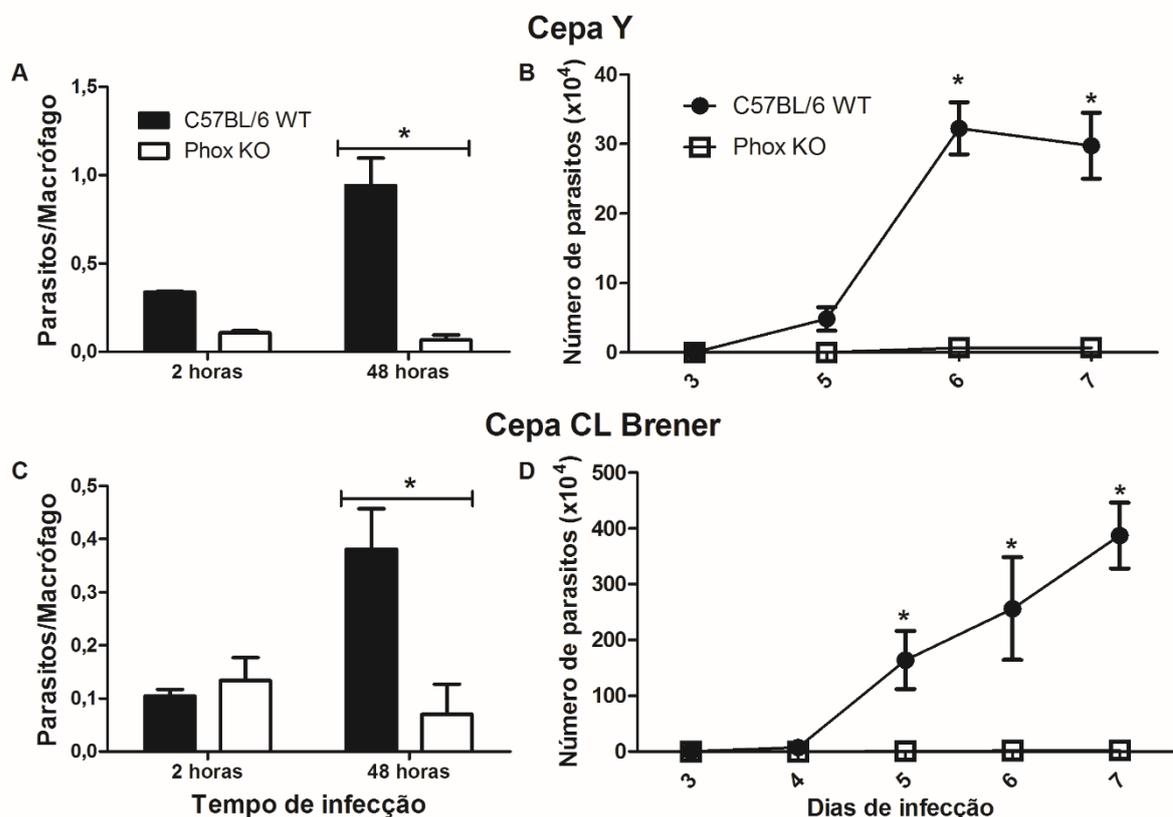


Figura 16: Macrófagos Phox KO apresentam parasitismo reduzido. Macrófagos inflamatórios obtidos da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 WT e Phox KO quatro dias após o estímulo com tioglicolato foram infectados com as cepas Y (A, B) e CL Brener (C, D) de *T. cruzi*. Após duas horas de infecção as células foram lavadas para remoção dos parasitos extracelulares e então fixadas ou incubadas novamente com meio de cultivo por diferentes períodos. (A,C) Número de parasitos por macrófagos após 2 ou 48 horas de infecção. (B, D) Contagem de tripomastigotas livres no sobrenadante de culturas de macrófagos entre o 3^o e 7^o dia de infecção. Os gráficos são representativos de três experimentos diferentes. O símbolo asterisco (*) indica diferenças significativas entre os grupos destacados, $p < 0,05$.

4.8. Produção de NO por macrófagos Phox KO e C57BL/6 WT

Para avaliar se as diferenças observadas na infecção de macrófagos Phox KO e C57BL/6 WT poderiam estar relacionadas com a capacidade de produção de NO por essas células, o método de Griess foi utilizado. As células foram plaqueadas, estimuladas ou infectadas e após 48 horas, o sobrenadante foi coletado para dosagem de nitrito. Não foram observadas diferenças significativas entre macrófagos Phox KO e C57BL/6 WT em relação à produção de NO. A infecção de macrófagos com *T. cruzi* não induziu a produção de NO, que foi similar aos níveis basais observados nessas células não estimuladas. O tratamento com IFN/LPS, por sua vez, induziu a produção de quantidades significativas de NO, tanto em macrófagos Phox KO quanto em macrófagos C57BL/6 WT. Os níveis de produção, entretanto, não foram diferentes entre essas células submetidas ao mesmo estímulo. A produção de NO por células previamente estimuladas foi potencializada pela infecção com *T. cruzi* (Figura 17).

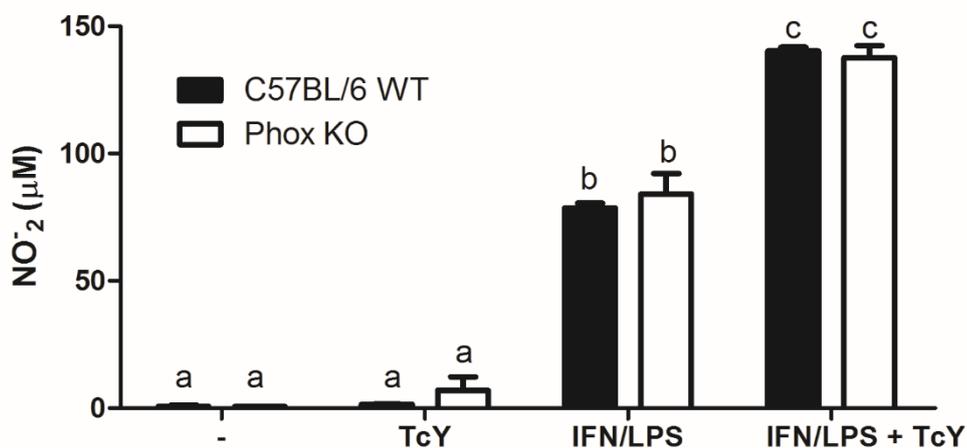


Figura 17: Produção de NO por macrófagos Phox KO e C57BL/6 WT. Macrófagos inflamatórios obtidos da cavidade peritoneal de camundongos Phox KO e C57BL/6 WT quatro dias após o estímulo com tioglicolato foram estimulados com IFN/LPS e/ou infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Após 48 horas, a produção de NO por macrófagos foi quantificada pelo método de Griess.

4.9. Inibidores da produção de ROS reduzem a proliferação de *T. cruzi* em macrófagos

Como mostrado anteriormente, macrófagos de camundongos Phox KO apresentaram parasitismo reduzido em comparação a macrófagos de animais C57BL/6 WT. O passo seguinte teve como objetivo investigar se a ausência de ROS foi o fator responsável pela redução do crescimento parasitário em macrófagos Phox KO. Para isso a inibição da produção de ROS por macrófagos C57BL/6 WT foi realizada utilizando-se diferentes antioxidantes.

Macrófagos C57BL/6 WT foram tratados com os antioxidantes SOD-PEG, CAT-PEG, NAC e apocinina e posteriormente infectados com as populações TcWT e TcMTH da cepa CL Brener de *T. cruzi*. Como modelo de comparação, macrófagos Phox KO também foram infectados. Os resultados obtidos indicaram que todos os antioxidantes utilizados reduziram o parasitismo nos macrófagos C57BL/6 WT a níveis comparáveis àqueles obtidos com macrófagos Phox KO. Essa redução foi melhor observada quando os macrófagos foram infectados com os parasitos TcMTH, uma vez que os níveis de infecção obtidos com essa população foram maiores e mais facilmente visualizados após 48 horas de infecção (Figura 18 A, B). O número de tripomastigotas liberadas no sobrenadante das culturas de macrófagos C57BL6/WT infectados com TcWT e TcMTH também foi reduzido após o tratamento dessas células com apocinina (Figura 18E). O tratamento de macrófagos C57BL/6 WT com NAC e apocinina também reduziu o parasitismo dessas células após a infecção com a cepa Y de *T. cruzi* (Figuras 18 C, D).

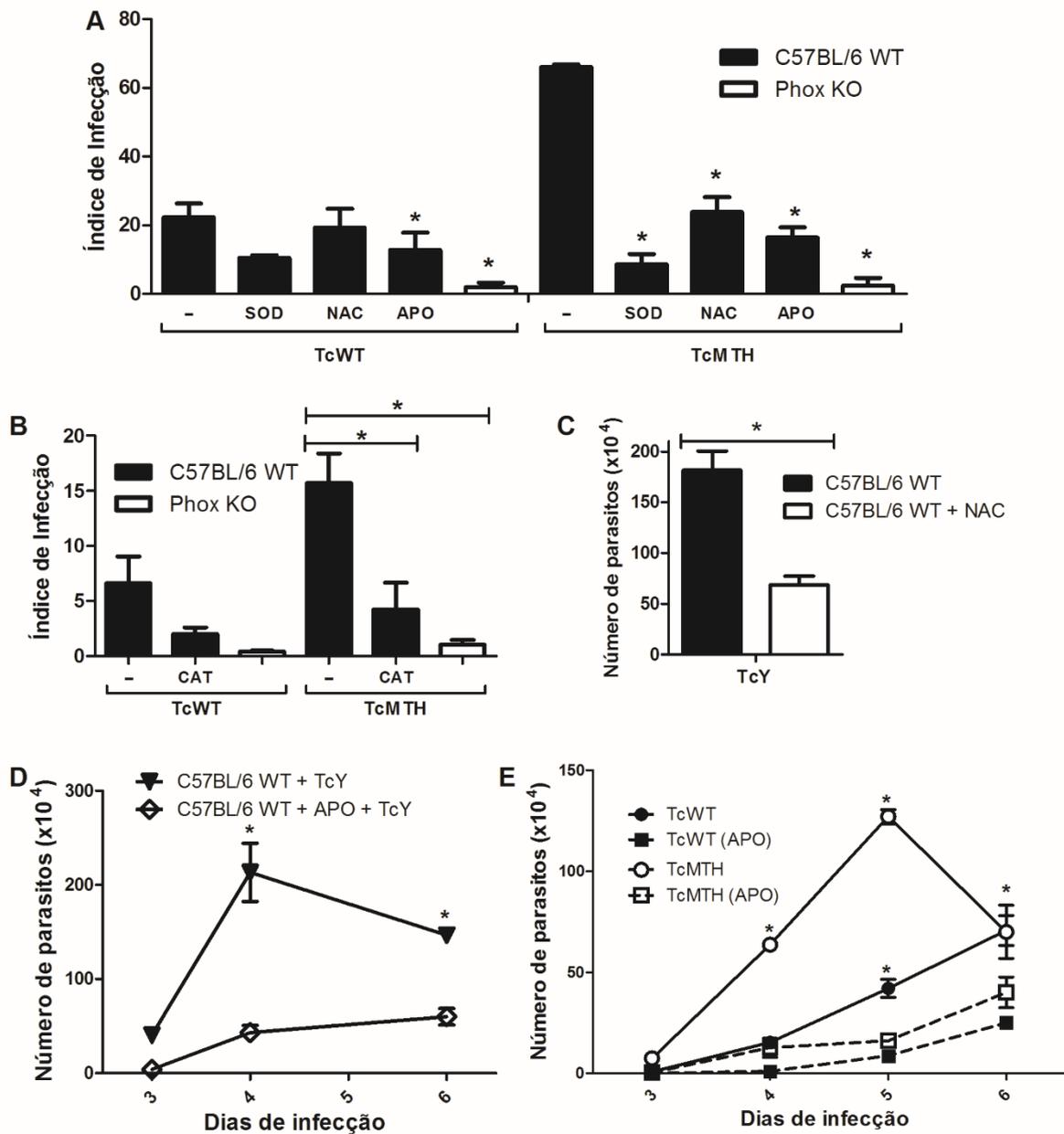


Figura 18: Antioxidantes reduzem a proliferação de *T. cruzi* em macrófagos. Macrófagos inflamatórios foram retirados da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 WT e Phox KO quatro dias após estímulo com tioglicolato. Macrófagos de camundongos C57BL/6 WT foram incubados com 300 μ M de apocinina (APO), 1mM de N-acetil-cisteína (NAC), 25U de superóxido dismutase-polietileno glicol (SOD) ou 40U de catalase-polietileno glicol (CAT) duas horas antes da infecção com diferentes parasitos. As células foram lavadas para remoção dos parasitos extracelulares e fixadas ou incubadas novamente com meio de cultivo acrescido dos antioxidantes por diferentes períodos. (A, B) As lâminas foram coradas e contadas para determinação do índice de infecção. O índice de infecção é uma relação entre o número de macrófagos infectados (MI) e amastigotas (A) pelo número total de macrófagos (MT) [(A x MI)/MT]. O número de parasitos da cepa Y (C, D) e TcWT, TcMTH (E) liberado no sobrenadante das culturas celulares, entre o 3^o e 7^o dia de infecção foi quantificado. Os gráficos são representativos de três experimentos diferentes. O símbolo asterisco (*) indica diferenças significativas entre os grupos destacados, $p < 0,05$.

4.10. ROS podem servir como moléculas sinalizadoras importantes para a replicação do parasito *T. cruzi*

Alguns trabalhos têm demonstrado que as ROS podem agir como moléculas sinalizadoras para as células (FINZI *et al.*, 2004; NOGUEIRA *et al.*, 2011). Os resultados apresentados anteriormente sugerem que as ROS são moléculas importantes para replicação do parasito *T. cruzi* em macrófagos. Dessa forma, levantou-se a hipótese de que o parasito *T. cruzi* precisaria de um sinal proveniente das ROS produzidas por macrófagos para se replicar de maneira efetiva nesta célula hospedeira.

Para testar tal hipótese, macrófagos Phox KO e macrófagos C57BL/6 WT cuja produção de ROS foi inibida por NAC foram tratados com H₂O₂ antes e depois da infecção com *T. cruzi*. Na ausência de H₂O₂, ambas as células apresentaram índices de infecção reduzidos em comparação ao índice de infecção de macrófagos C57BL/6 WT controles. Por outro lado, após receber o tratamento com H₂O₂, macrófagos Phox KO e macrófagos tratados com NAC tiveram aumento significativo de seus índices de infecção. Esse aumento foi comparável ao índice de infecção observado em macrófagos C57BL/6 WT controles. Tais resultados foram observados em infecções realizadas com duas populações da cepa CL Brener de *T. cruzi*: TcWT e TcMTH (Figura 19A).

Para melhor caracterizar este fenômeno, formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa CL Brener (TcWT) foram tratadas com H₂O₂ durante 30 minutos e utilizadas nos ensaios de infecção de macrófagos Phox KO e C57BL/6 WT. O tratamento dos parasitos com H₂O₂ não afetou a infecção de macrófagos C57BL/6

WT, mas aumentou significativamente o índice de infecção de macrófagos Phox KO (Figura 19B).

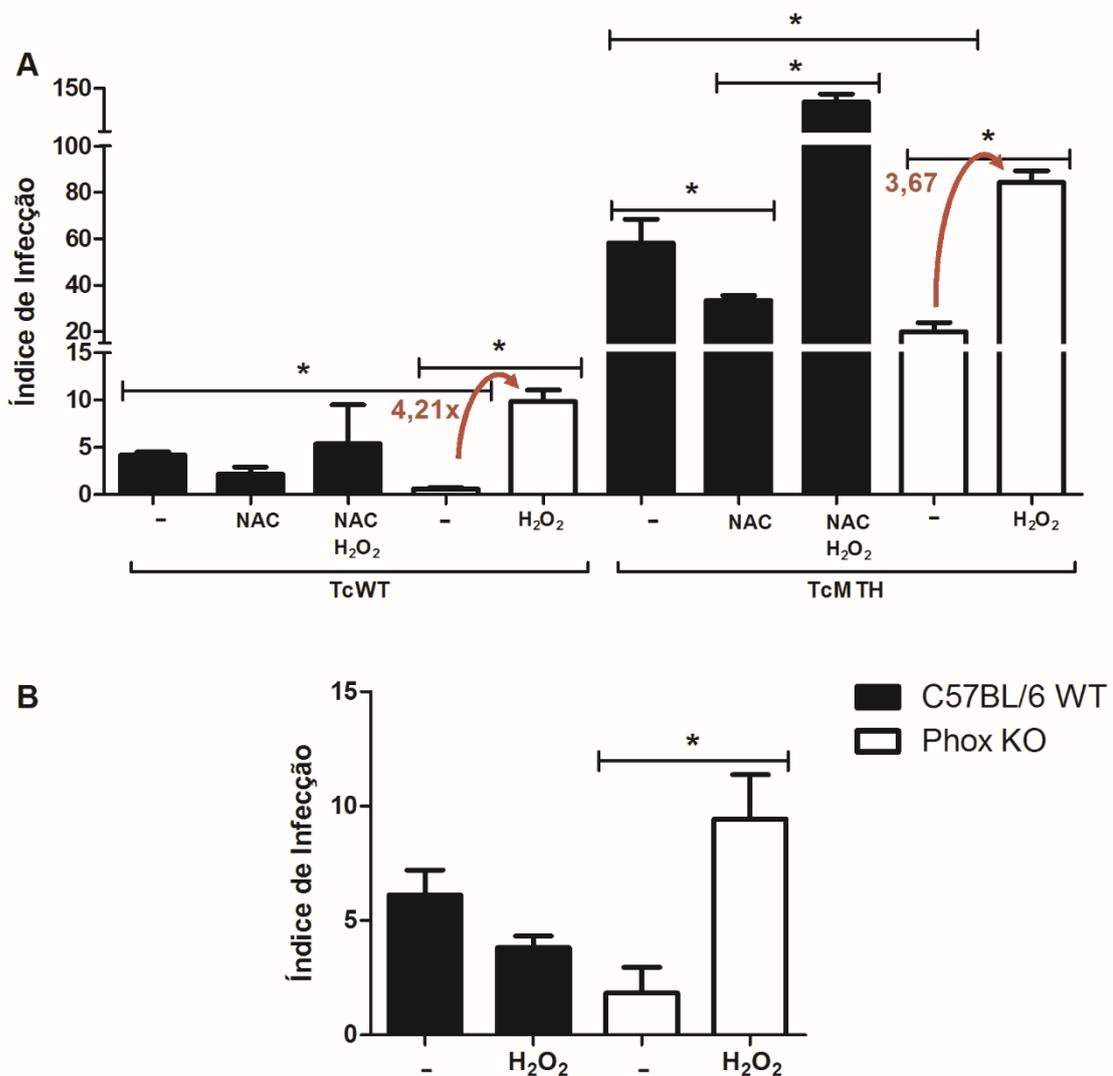


Figura 19: O parasito *T. cruzi* precisa de um sinal proveniente das ROS para se multiplicar em macrófagos. (A) Macrófagos inflamatórios foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos Phox KO e C57BL/6 WT quatro dias após a injeção de tioglicolato. Macrófagos C57BL/6 WT foram incubados com 1mM de N-acetil-cisteína (NAC) 2 horas antes da infecção. As células foram tratadas com 100µM H₂O₂ 30 minutos antes da infecção com os parasitos. Após a infecção, as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e incubadas novamente em meio de cultivo ou meio de cultivo acrescido de NAC ou H₂O₂ por 72 horas. As lâminas foram fixadas, coradas e quantificadas para determinação do índice de infecção. O índice de infecção é uma relação entre o número de macrófagos infectados (MI) e amastigotas (A) pelo número total de macrófagos (MT) [(A x MI/MT)]. (B) Macrófagos inflamatórios obtidos da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 WT Phox KO foram infectados com parasitos previamente tratados com 50µM de H₂O₂ por 30 minutos. Após a infecção, as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e incubadas novamente em meio de cultivo. Após 72 horas, as lâminas foram fixadas, coradas e quantificadas para determinação do índice de infecção. Os gráficos são representativos de três experimentos diferentes. O símbolo asterisco (*) indica diferenças significativas entre os grupos destacados, p<0,05.

4.11. Parasitos que superexpressam a enzima catalase apresentam parasitismo aumentado em macrófagos

O *T. cruzi*, por ser um parasito intracelular, é constantemente exposto às ROS, que podem ser geradas pelo seu próprio metabolismo aeróbico ou pela resposta imune do hospedeiro (FINZI *et al.*, 2004). Como mencionado anteriormente, o parasito possui um sistema antioxidante complexo e efetivo para lidar com o estresse oxidativo, apesar da ausência da enzima catalase (BOVERIS *et al.*, 1980), que promove a detoxificação do peróxido de hidrogênio.

Para entender qual seria o papel desta enzima no parasito *T. cruzi*, parasitos que superexpressam a enzima catalase de *E. coli* (EcCat) foram utilizados nos ensaios de infecção. Os parasitos EcCat mostraram parasitismo aumentado em macrófagos quando comparados com os parasitos TcWT. Da mesma forma, como mostrado anteriormente, macrófagos de camundongos Phox KO também não sustentaram a infecção com parasitos EcCat (Figura 20A).

Macrófagos C57BL/6 WT tratados com o antioxidante catalase apresentaram parasitismo reduzido após a infecção com os parasitos TcWT e TcMTH (Figura 20B). Entretanto, o crescimento da população de parasitos EcCat em macrófagos tratados com o antioxidante catalase não diminuiu.

Os parasitos EcCat também responderam ao tratamento com H₂O₂, aumentando sua proliferação em macrófagos Phox KO (Figura 20A). Essa resposta à H₂O₂, entretanto, é menor, quando comparada à intensidade de resposta obtida em infecções realizadas com parasitos TcWT e TcMTH. Como pode ser observado na figura 19A, parasitos TcWT e TcMTH tratados com H₂O₂ aumentaram 3,67 e 4,21 vezes, respectivamente, o parasitismo em macrófagos Phox KO. Na figura 20

podemos observar que o parasito TcWT tratado com H₂O₂ aumenta 5,15 vezes seu parasitismo em macrófagos Phox KO, enquanto que EcCat tratado com H₂O₂ aumenta apenas 2,65 vezes o parasitismo nestas células.

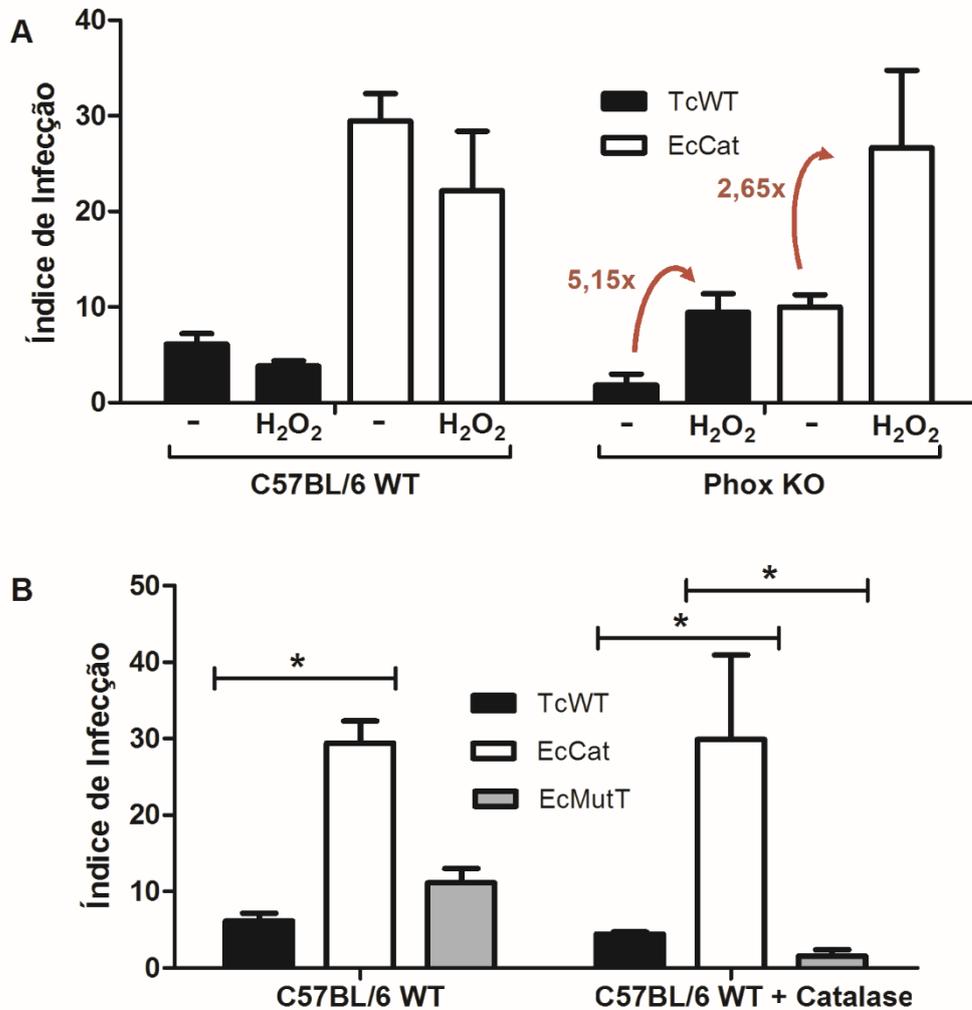


Figura 20: Parasitos que superexpressam a enzima catalase apresentam parasitismo aumentado em macrófagos. Macrófagos inflamatórios foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos Phox KO e C57BL/6 WT quatro dias após a injeção de tioglicolato e infectados com diferentes populações de *T.cruzi*. Após a infecção, as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e incubadas novamente em meio de cultivo por 72 horas. As lâminas foram fixadas, coradas e quantificadas para determinação do índice de infecção. O índice de infecção é uma relação entre o número de macrófagos infectados (MI) e amastigotas (A) pelo número total de macrófagos (MT) [(A x MI/MT)]. (A) Infecção de macrófagos com parasitos tratados ou não com H₂O₂ por 30 minutos. (B) Macrófagos C57BL/6 WT foram tratados com o antioxidante catalase e infectados com parasitos selvagens ou modificados. Os gráficos são representativos de três experimentos diferentes. O símbolo asterisco (*) indica diferenças significativas entre os grupos destacados, $p < 0,05$.

4.12. Altas concentrações de ROS não induzem o crescimento do parasito *T. cruzi* em macrófagos

Os resultados apresentados mostraram que parasitos resistentes ao estresse oxidativo multiplicam-se melhor em macrófagos. Entretanto, células deficientes na produção de ROS não sustentam a infecção pelo parasito *T. cruzi*. As células apresentam uma gama variada de respostas aos oxidantes: altas concentrações de ROS podem desencadear o estresse oxidativo e resultar em danos, enquanto que baixas concentrações podem exercer papéis fisiológicos importantes para sinalização e proliferação celular (FINZI *et al.*, 2004).

Nesse contexto, parasitos foram tratados com diferentes concentrações de H₂O₂ e utilizados em ensaios de infecção de macrófagos de camundongos Phox KO e C57BL/6 WT. Não foram encontradas diferenças significativas no índice de infecção de macrófagos C57BL/6 WT infectados com parasitos tratados com até 200µM H₂O₂. Entretanto, a concentração mais alta de H₂O₂ utilizada (300 µM) foi tóxica para o parasito. Baixas concentrações de H₂O₂ (50µM e 100µM) promoveram a replicação dos parasitos em macrófagos Phox KO. A concentração de 200µM de H₂O₂ reduziu o parasitismo e a concentração mais alta, 300 µM, também se mostrou tóxica (Figura 21). Tais resultados sugerem que baixas concentrações de ROS contribuem para o crescimento dos parasitos nas células, funcionando como moléculas sinalizadoras para o parasito.

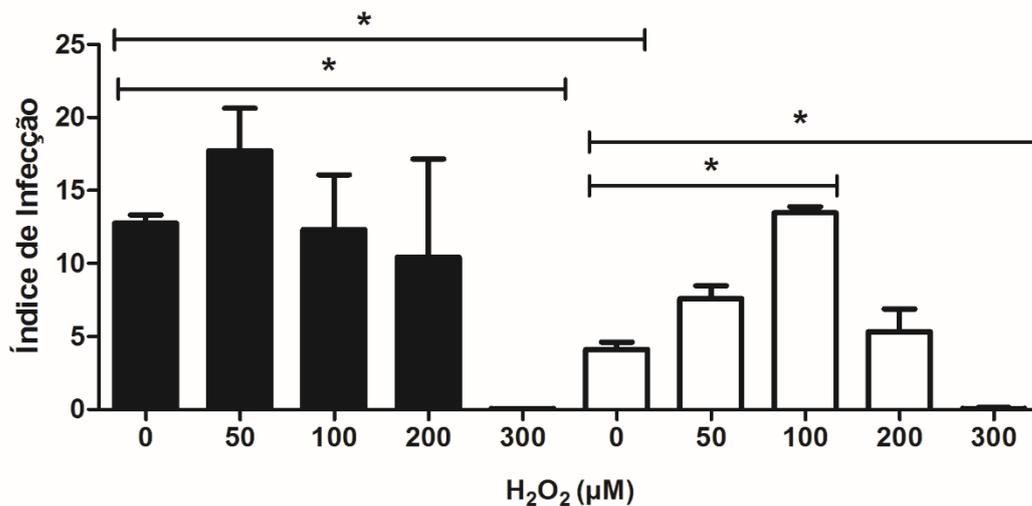


Figura 21: Em altas concentrações, ROS não promovem o crescimento do parasito *T. cruzi*. Macrófagos inflamatórios obtidos da cavidade peritoneal de camundongos Phox KO e C57BL/6 WT após quatro dias de infecção foram infectados com parasitos *T. cruzi* previamente tratados com diferentes concentrações de H₂O₂ por 30 minutos. Após duas horas de infecção, as células foram lavadas para remoção dos parasitos extracelulares e incubadas novamente com meio de cultivo. Após 72 horas as lâminas foram fixadas, coradas e contadas para determinação do índice de infecção. Os gráficos são representativos de três experimentos diferentes. O símbolo asterisco (*) indica diferenças significativas entre os grupos destacados, $p < 0,05$.

4.13. Infecções *in vivo*

Experimentos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram que camundongos Phox KO e C57BL/6 WT apresentam níveis de parasitemia similares após a infecção com a cepa Y de *T. cruzi*. Entretanto, nestes experimentos, os animais Phox KO, sucumbem a infecção precocemente (SANTIAGO *et al.*, 2012).

A fim de se corroborar estes resultados, ensaios de infecção foram realizados com parasitos da cepa CL Brener, TcWT e TcMTH. Camundongos C57BL/6 WT e Phox KO foram infectados com um milhão de tripomastigotas de *T. cruzi* e a parasitemia foi avaliada a partir do 3º dia de infecção.

Como esperado, camundongos infectados com os parasitos TcMTH apresentaram parasitemia elevada quando comparados aos animais infectados com

parasitos TcWT. Essa diferença foi mais proeminente no 5º dia de infecção (Figura 22A). Como mostrado anteriormente, *in vitro*, os parasitos TcMTH apresentam maior capacidade replicativa do que parasitos TcWT (Figura 11). Além disso, resultados anteriores de experimentos *in vivo* utilizando-se camundongos Swiss, também mostraram que as infecções com a cepa EcMutT resultam em níveis de parasitemia mais elevados do que aquelas realizadas com parasitos TcWT (Figura 13, (AGUIAR *et al.*, 2013)).

Corroborando os experimentos realizados com a cepa Y de *T. cruzi*, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de parasitemia dos camundongos C57BL/6 WT e Phox KO. Ambos apresentaram pico de infecção cinco dias após a injeção dos parasitos e queda subsequente no número de parasitos no sangue. Entretanto, camundongos deficientes da enzima NADPH oxidase funcional não sobreviveram à infecção, independente da população de *T. cruzi* utilizada. Após 40 dias de infecção, 100% dos camundongos C57BL/6 WT mantiveram-se vivos, enquanto que os animais Phox KO apresentaram 100% de mortalidade já no 12º dia de infecção (Figura 22B).

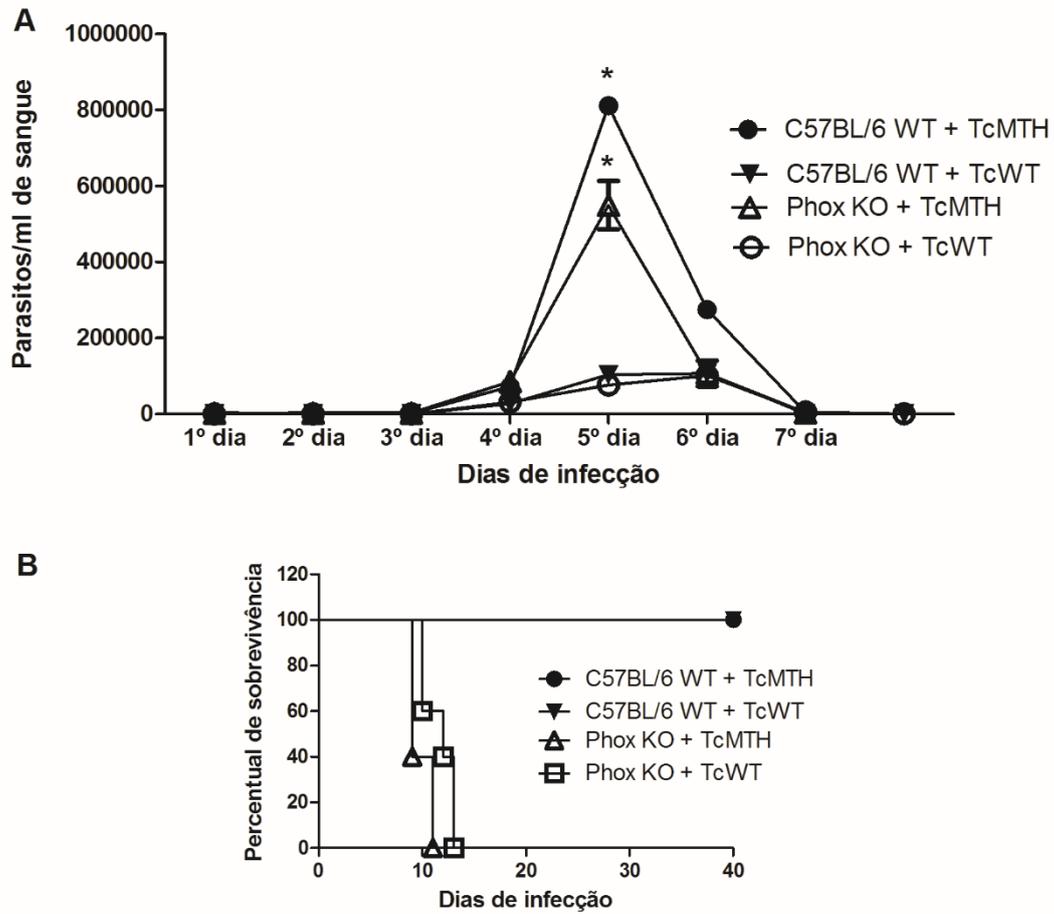


Figura 22: Parasitemia e mortalidade de camundongos C57BL/6 WT e Phox KO infectados com parasitos TcWT e TcMTH. Camundongos foram infectados por via intraperitoneal com 1×10^6 parasitos. (A) Média da parasitemia ($n=4$) e (B) Mortalidade ($n=5$). Os gráficos são representativos de três experimentos diferentes. O símbolo asterisco (*) indica diferenças significativas entre os grupos destacados, $p < 0,05$.

5. Discussão

O processo de estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a atuação de antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres em detrimento da velocidade com a qual são removidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Diversos autores têm demonstrado que a infecção de macrófagos por *T. cruzi* resulta na produção de ROS, provenientes da NADPH oxidase (ALVAREZ *et al.*, 2011; BERGERON *et al.*, 2008; PAIVA *et al.*, 2012). A duração exata dessa produção de ROS por células infectadas não tem sido muito bem determinada. Alguns trabalhos mostram que esta produção se inicia e se potencializa nos primeiros minutos de infecção (ALVAREZ *et al.*, 2011; BERGERON *et al.*, 2008), enquanto outros demonstram que essa produção se inicia após 6 horas de infecção e se estende por até 24 horas (DHIMAN; GARG, 2014; PAIVA *et al.*, 2012). Antes de iniciar os experimentos visando entender melhor o papel das ROS durante a infecção, avaliamos se a internalização do parasito em macrófagos induz de fato a produção de ROS em nosso sistema experimental. Nossos resultados mostraram que macrófagos infectados com *T. cruzi* produzem ROS nos momentos iniciais da infecção, possivelmente através da indução da atividade da NADPH oxidase, uma vez que a produção de ROS não foi detectada em macrófagos Phox KO e nem em macrófagos tratados com apocinina, um inibidor da Nox2. O tratamento dos macrófagos com os antioxidantes SOD e NAC também reduziu a produção de ROS após a infecção. A utilização de NAC, SOD e apocinina como antioxidantes, reduzindo a produção de ROS em macrófagos também é comum em diversos ensaios experimentais (BERGERON *et al.*, 2008; PAIVA *et al.*, 2012). Esses resultados constituíram a base dos ensaios experimentais posteriores, nos quais pressupomos que a produção de ROS em macrófagos é induzida pelo parasito e que pode ser inibida pelo tratamento com antioxidantes.

O parasito é exposto às ROS durante todo seu ciclo de vida e não apenas ao infectar fagócitos. Ao infectar o hospedeiro vertebrado, as tripomastigotas invadem as células no local da inoculação, como por exemplo, fibroblastos, macrófagos e células epiteliais (BURLEIGH; ANDREWS, 1995; DE; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010) e permanecem entre uma e duas horas no interior do vacúolo parasitóforo. Após este período o parasito alcança o citoplasma das células, onde completa sua diferenciação em formas amastigotas. Após um período de aproximadamente 35 horas, as amastigotas iniciam o processo de divisão binária no citoplasma. O tempo médio de duplicação varia de acordo com a cepa. Finalmente, as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas e são liberadas para o espaço extracelular (ALVES; COLLI, 2007). Essas tripomastigotas infectivas alcançam a corrente sanguínea e se disseminam para outras células, como as do miocárdio e células ganglionares do sistema autônomo nervoso, que inervam as paredes do esôfago e intestino. No interior dos macrófagos residentes o parasito precisa lidar com as ROS produzidas pela NADPH oxidase (CARDONI *et al.*, 1997; MUNOZ-FERNANDEZ; FERNANDEZ; FRESNO, 1992). No tecido cardíaco, a invasão pelo parasito pode desencadear uma disfunção mitocondrial e gerar ROS no citoplasma de cardiomiócitos (GUPTA *et al.*, 2009). No hospedeiro invertebrado, o *T. cruzi* também é exposto ao estresse oxidativo e precisa lidar com ROS produzidas pela degradação da hemoglobina (PAES; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2001). A degradação da hemoglobina resulta na liberação de grandes quantidades de heme, uma molécula conhecida por aumentar a formação de ROS (RYTER; TYRRELL, 2000) e alterar a seletividade e permeabilidade de membranas (SCHMITT; FREZZATTI, Jr.; SCHREIER, 1993). Além disso, o parasito também precisa lidar com a produção de

espécies reativas de nitrogênio induzidas por mecanismos de defesa do hospedeiro invertebrado (WHITTEN *et al.*, 2007).

A constante exposição do *T. cruzi* a condições de estresse oxidativo ao longo de seu ciclo de vida (CARDONI *et al.*, 1997; PAES; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2001; PIACENZA *et al.*, 2009a) pode resultar na formação de nucleotídeos oxidados, provocando danos em seu DNA. Para lidar com as ROS o parasito apresenta uma eficiente maquinaria antioxidante (PIACENZA *et al.*, 2009a) e conta também com uma série de enzimas relacionadas ao reparo de DNA (AGUIAR *et al.*, 2013; EL-SAYED *et al.*, 2005). Essas enzimas de reparo de DNA são essenciais para sobrevivência do parasito nesses ambientes desfavoráveis. Recentemente nosso grupo demonstrou que parasitos que apresentam a atividade 8-oxo-dGTPase aumentada multiplicam-se melhor do que parasitos selvagens em fibroblastos de camundongos Suíços (AGUIAR *et al.*, 2013). Essa atividade 8-oxo-dGTPase é proveniente da enzima MutT de *E. coli* ou da enzima TcMTH de *T. cruzi*, que realizam a hidrólise de 8-oxo-dGTP a 8-oxo-dGMP no pool de nucleotídeos, prevenindo a incorporação deste nucleotídeo oxidado no DNA. Neste trabalho, nós demonstramos que esses parasitos modificados multiplicam-se melhor em culturas de macrófagos. Essa maior capacidade de multiplicação não está relacionada à capacidade de infecção destes parasitos, visto que ambos, selvagens e recombinantes, apresentam a mesma capacidade de invadir macrófagos. Tal resultado não foi surpreendente, uma vez que não se esperava que a superexpressão de enzimas de reparo influenciasse o processo de interação parasito-célula hospedeira. *In vitro*, essa diferença na taxa de multiplicação dos parasitos modificados foi evidente após 48 horas de infecção, quando o processo de replicação já foi iniciado pelos parasitos, e tornou-se ainda maior após 72 horas de

infecção. Foi também a partir de 72 horas de infecção que foram detectadas formas tripomastigotas liberadas no sobrenadante das culturas celulares. Esses parasitos modificados, quando expostos a diferentes fontes de estresse oxidativo (H_2O_2 e peroxinitrito) foram capazes de prevenir a incorporação da 8-oxo-dGTP em seu DNA. Estudos realizados com células cancerosas também mostraram que essas células, através da atividade da enzima MTH1, análoga da TcMTH de *T. cruzi*, também inibem a incorporação de nucleotídeos oxidados (GAD *et al.*, 2014). Além de crescerem melhor em macrófagos, os parasitos modificados também se multiplicam melhor *in vivo*, em infecções com camundongos C57BL/6 WT e Suíços. A hidrólise da 8-oxodGTP pode ser um fator responsável por prevenir lesões no DNA, o que explicaria a maior capacidade replicativa observada nos parasitos com atividade 8-oxo-dGTPase aumentada. Essa melhor capacidade de infecção dos parasitos modificados, resistentes ao estresse oxidativo, evidencia a importância das ROS para o controle do *T. cruzi*.

De fato, vários trabalhos foram publicados associando a morte dos parasitos à produção de ROS. Pesquisadores demonstraram que a habilidade de macrófagos ativados de controlar o crescimento de *T. cruzi in vitro* (NOGUEIRA; COHN, 1978; REED *et al.*, 1987) e *in vivo* (NATHAN *et al.*, 1979) devia-se à produção de H_2O_2 . A importância do mecanismo de explosão respiratória na eliminação dos parasitos intracelulares também foi evidenciada utilizando-se macrófagos tratados com PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate), que são incapazes de liberar ROS quando reestimulados. Nessas células, o tratamento prévio com PMA contribui para o crescimento do *T. cruzi* (MURRAY, 1982). Além disso, evidências recentes mostram que o peroxinitrito, produto de reações do óxido nítrico com ROS, é um mediador da morte desse parasito (ALVAREZ *et al.*, 2011).

Entretanto, a necessidade absoluta das ROS no processo de combate ao parasito foi contestada por estudos que demonstraram que as células utilizam diferentes mecanismos independentes de ROS para eliminar o *T. cruzi* (MCCABE; MULLINS, 1990; MUNOZ-FERNANDEZ; FERNANDEZ; FRESNO, 1992). É bem estabelecido que a infecção por *T. cruzi* induz a produção de NO em macrófagos estimulados com IFN- γ (GAZZINELLI *et al.*, 1992; MUNOZ-FERNANDEZ; FERNANDEZ; FRESNO, 1992) e que essa produção exerce um papel importante na eliminação do parasito. Dada a diferença observada no crescimento intracelular dos parasitos modificados, avaliamos se estes parasitos poderiam modular de forma diferencial a produção de NO pelos macrófagos. Assim como previamente publicado, a infecção de macrófagos não estimulados com diferentes populações de parasitos não resultou na indução da produção de NO (BERGERON; OLIVIER, 2006).

Esses dados mostram que os parasitos modificados, que apresentam atividade 8-oxo-dGTPase aumentada, não têm capacidade de modular a produção de NO em macrófagos, mas mostram-se mais aptos a sobreviver porque incorporam menos guanina oxidada em seu DNA. Avaliamos então se outros mecanismos estariam envolvidos no aumento da resistência desses parasitos, investigando a expressão de enzimas da rede antioxidante e a sua resistência à oxidação. Uma vez que as ROS possuem um papel importante na eliminação dos parasitos avaliamos também qual seria a resposta desses parasitos ao tratamento com H₂O₂, em relação à produção de enzimas antioxidantes. Nossos resultados mostram que os parasitos TcMTH e EcMutT apresentaram aumento na atividade de suas enzimas antioxidantes e aumento nos níveis das enzimas antioxidantes CPX e MPX, em comparação ao parasito TcWT. Essas enzimas têm capacidade de detoxificar

ONOO[•], H₂O₂ e hidroperóxidos orgânicos de cadeia curta (PIACENZA *et al.*, 2013; TRUJILLO *et al.*, 2004). Os níveis da enzima CPX nos parasitos EcMutT foram três vezes mais altos do que os níveis observados nos parasitos TcWT. O tratamento de ambos os parasitos com H₂O₂ não provocou alterações nos níveis desta enzima. Por sua vez, os níveis da enzima MPX foram alterados tanto nos parasitos TcROCK quanto TcMTH após o tratamento oxidativo, sendo maiores nos parasitos TcMTH. Além dessas enzimas, o *T. cruzi* possui quatro enzimas ferro-superóxido dismutases (FeSODs) responsáveis pela eliminação do radical O₂^{•-}, que é dismutado em H₂O₂ e oxigênio molecular (MATEO *et al.*, 2008). Não foram observadas diferenças nos níveis da enzima SODB citosólica entre os parasitos selvagens e modificados. Além disso, os níveis desta enzima não foram alterados após o tratamento oxidativo com H₂O₂, possivelmente porque esta enzima não está envolvida na detoxificação do H₂O₂. A enzima citosólica SODB é particularmente resistente à inativação por peroxinitrito, sugerindo que ela participe principalmente como uma enzima da defesa antioxidante, enquanto que a enzima mitocondrial SODA atua como um sensor de estresse oxidativo, participando do processo de sinalização redox mediado por O₂^{•-} (PIACENZA *et al.*, 2013; PROLO; ALVAREZ; RADI, 2014). Alguns trabalhos demonstraram que os níveis de CPX, MPX e SODA mitocondrial são aumentados em formas infectivas do parasito (ATWOOD, III *et al.*, 2005; PARODI-TALICE *et al.*, 2007; PIACENZA *et al.*, 2009b). A relação destas enzimas com a capacidade infectiva do parasito poderia explicar porque MPX e CPX estão aumentadas nos parasitos modificados, indicando que a expressão de EcMutT ou TcMTH poderia influenciar a expressão de enzimas antioxidantes do parasito. Dessa forma, a maior capacidade replicativa dos parasitos modificados além de ser explicada por sua melhor capacidade de reparo ao dano oxidativo no DNA, também pode ser explicada

pela habilidade desses parasitos em modular diferencialmente as vias de enzimas antioxidantes, mesmo quando não são expostos ao H₂O₂.

Por enquanto, os resultados discutidos neste trabalho reforçam a ideia tradicional de que as ROS constituem um risco para o *T. cruzi*, uma vez que parasitos modificados apresentam maior capacidade replicativa, provavelmente devido a sua melhor capacidade de lidarem com condições de estresse oxidativo. Dessa forma, esperava-se que com a remoção da NADPH oxidase de macrófagos, uma enzima crucial para a produção de ROS, os parasitos apresentassem melhor capacidade de crescimento. Entretanto, macrófagos de camundongos Phox KO infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* apresentaram parasitismo reduzido quando comparados a macrófagos de animais C57BL/6 WT. Essa diferença não está relacionada à capacidade de internalização dos parasitos, uma vez que ambos os macrófagos apresentam a mesma capacidade de captação de parasitos. Isso foi demonstrado pela contagem de parasitos no citoplasma das células após duas horas de infecção, quando diferenças no índice de infecção entre os macrófagos Phox KO e C57BL6/WT não foram observadas. Recentemente foi demonstrado que a deficiência da enzima Nox2 em camundongos nocautes para a subunidade p47^{Phox} da NADPH oxidase também não interfere com o processo de internalização dos parasitos (DHIMAN; GARG, 2014). Macrófagos de camundongos Phox KO infectados com a cepa Y de *T. cruzi* também apresentaram parasitismo reduzido após 48 de infecção. A contagem de parasitos no sobrenadante das culturas infectadas mostrou que em macrófagos Phox KO o número de parasitos se mantém baixo tanto na infecção com a cepa CL Brener, quanto com a cepa Y de *T. cruzi*. Esses resultados corroboram resultados obtidos anteriormente, em um trabalho que

defende a ideia de que as ROS são, na verdade, necessárias para o crescimento do *T. cruzi* (PAIVA *et al.*, 2012).

Entretanto, experimentos realizados com um clone de macrófagos da linhagem J774, que perderam a capacidade de produzir ROS, demonstraram que o *T. cruzi* se multiplica melhor nessa linhagem celular modificada (TANAKA; TANOWITZ; BLOOM, 1983). Além disso, um trabalho publicado recentemente com a cepa Sylvio X10/4 mostrou que a deficiência da enzima Nox2 em camundongos nocautes para a subunidade p47^{Phox} da NADPH oxidase não resulta em diferenças no número de parasitos liberados de macrófagos infectados (DHIMAN; GARG, 2014). Essa diferença pode estar relacionada à cepa de *T. cruzi* utilizada ou até mesmo aos níveis de ROS detectados em macrófagos após a infecção com o parasito. Nossos resultados mostram que tanto a infecção por *T. cruzi* quanto o tratamento de macrófagos com zimozam, não induzem alterações nos níveis de ROS detectados em macrófagos Phox KO, que permanecem inalterados e próximos aos níveis basais observados em macrófagos não infectados. Dhiman e Garg, por sua vez, mostram que os níveis de ROS detectados em células de camundongos nocautes são reduzidos se comparados àqueles produzidos por células selvagens, mas permanecem significativamente altos se comparados aos níveis basais de produção de células não infectadas (DHIMAN; GARG, 2014).

Para tentar explicar as diferenças observadas nos níveis de infecção entre macrófagos Phox KO e C57BL/6 WT, a produção de NO por essas células foi avaliada. A infecção por *T. cruzi* por si, não desencadeou a produção de NO em nenhum dos macrófagos. Entretanto, ambos os macrófagos, quando estimulados com IFN- γ e LPS apresentaram níveis aumentados de nitrito no sobrenadante. Essa produção de nitrito foi potencializada quando ambos os macrófagos estimulados

foram infectados com *T. cruzi*. Resultados obtidos com macrófagos de linhagem J774 também mostraram que macrófagos estimulados com IFN- γ produzem NO e que essa produção torna-se maior após a infecção com o parasito (BERGERON; OLIVIER, 2006). *In vivo*, animais Phox KO apresentam níveis elevados de nitrito e nitrato no soro quando comparados a camundongos C57BL/6 WT (SANTIAGO *et al.*, 2012). Entretanto, *in vitro*, a modulação da produção de NO por macrófagos Phox KO e C57BL/6 WT não explica as diferenças observadas na capacidade infectiva nessas células.

Talvez a replicação reduzida nos macrófagos Phox KO pudesse ser explicada pela existência de algum defeito envolvendo outros aspectos da maquinaria dessas células. Entretanto, o tratamento de macrófagos C57BL/6 WT com apocinina, produz o mesmo efeito, reduzindo a proliferação tanto de parasitos da cepa Y, quanto da cepa CL Brener de *T. cruzi*. Esses resultados sugerem então que existe um sinal, proveniente de produtos primários ou secundários da NADPH oxidase, necessário para a multiplicação do parasito. A remoção do $O_2^{\bullet-}$ (produto direto a NADPH oxidase) pela SOD ou do H_2O_2 pela catalase, ou do estresse oxidativo de forma geral pela adição de NAC a macrófagos C57BL/6 WT, também resulta na inibição do crescimento dos parasitos, de maneira comparável à observada em macrófagos Phox KO. O tratamento com essas moléculas reduziu a proliferação tanto de parasitos da cepa Y, quanto da cepa CL Brener de *T. cruzi*. Em parasitos da cepa CL Brener, essa inibição foi ainda mais evidente em ensaios experimentais realizados com a população TcMTH, que apresenta maior capacidade de replicação, uma vez que lida melhor com o estresse oxidativo. Estes dados indicam que os parasitos precisam de um sinal proveniente do macrófago hospedeiro para se multiplicarem efetivamente em seu interior. Nossos resultados

sugerem que os parasitos precisam de baixas concentrações de ROS, que atuam como moléculas sinalizadoras, contribuindo para seu crescimento no interior das células.

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de parasitemia de camundongos Phox KO e C57BL/6 WT. Isso poderia ser explicado pelo fato de que as ROS são moléculas importantes para eventos de sinalização em macrófagos, mas não em outros tipos celulares, como por exemplo, fibroblastos (PAIVA *et al.*, 2012). Estes dados contrastam com trabalhos que relatam aumento na parasitemia de camundongos tratados com apocinina e infectados com a cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi* (DHIMAN; GARG, 2011) e aumento na parasitemia de camundongos Phox KO infectados com a cepa Y (PAIVA *et al.*, 2012) e com a cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi* (DHIMAN; GARG, 2014). Entretanto, nossos resultados de infecção *in vivo* utilizando a cepa CL Brener de *T. cruzi* corroboram o trabalho publicado previamente pelo nosso grupo com a cepa Y desse parasito (SANTIAGO *et al.*, 2012). Não sabemos explicar ao certo os resultados contraditórios obtidos com animais tratados com apocinina e animais Phox KO, mas é possível que a apocinina iniba outros mecanismos oxidativos independentes da Nox2. *In vitro*, a apocinina também tem demonstrado ter um efeito oxidativo (CASTOR; LOCATELLI; XIMENES, 2010). Entretanto, nossos resultados *in vitro* demonstram que a apocinina possui efeito consistente com a inibição da NOX2.

A produção desregulada de ROS, frequentemente tem sido relacionada à patogênese de diversas doenças, como câncer (GHOTI *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2010), obesidade (JIANG *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2012), diabetes (BAYNES, 1991; DOR; GLASER, 2013; TALCHAI *et al.*, 2012; WOLFF, 1993), aterosclerose (QIAO *et al.*, 2009; TAVAKOLI; ASMIS, 2012) e doenças cardiovasculares (SINGAL *et al.*,

2000). Por outro lado, em células eucarióticas superiores, as ROS também têm sido caracterizadas como importantes fontes de sinalização celular, atuando tanto no crescimento quanto na diferenciação das células (DROGE, 2002; RHEE, 2006; SARSOOR *et al.*, 2009). O aumento regulado na produção de radicais livres em um desequilíbrio temporário representa a base fisiológica da regulação redox (FREIN *et al.*, 2005) e neste caso, as ROS podem agir como segundos mensageiros na via intracelular de transdução de sinais (DROGE, 2002; RUDOLPH; FREEMAN, 2009; TRACHOOTHAM *et al.*, 2008).

Além do seu papel na eliminação dos parasitos, estudos mais recentes têm demonstrado que as ROS também podem participar de eventos de crescimento e sinalização em patógenos (FINZI *et al.*, 2004; FRATERNALE *et al.*, 2009; OBERLEY-DEEGAN *et al.*, 2010; TUNG; HSIEH; YANG, 2010; VLAHOS *et al.*, 2011). Estudos realizados com *Leishmania amazonensis* demonstraram que em condições de baixa disponibilidade de ferro, promastigotas ativam a expressão do transportador de ferro LIT1 e aumentam a captação de ferro, condição necessária para o processo de diferenciação. Este aumento na expressão de LIT1 induzido pela diminuição da disponibilidade de ferro resulta em um aumento na atividade da enzima FeSOD, que ativa a conversão de $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , que atua como molécula sinalizadora fundamental para a diferenciação de promastigotas em amastigotas infectivas (MITTRA *et al.*, 2013). Parasitos *L. chagasi*, incubados previamente com doses sub-letais de menadiona (gerador de $O_2^{\bullet-}$) e H_2O_2 , posteriormente apresentam uma resposta mais efetiva ao estresse oxidativo, se tornando mais resistentes aos efeitos tóxicos do H_2O_2 e mais virulentos em camundongos BALB/c (WILSON; ANDERSEN; BRITIGAN, 1994). Corroborando esses resultados, um trabalho realizado com *L. amazonensis* demonstrou que a inibição da produção de

ROS pelo tratamento com o antioxidante NAC reduziu a carga parasitária da pata e de linfonodos de camundongos BALB/c infectados. Os autores, entretanto, associaram a morte dos parasitos com o aumento dos níveis de GSH, que poderiam induzir a produção de NO em macrófagos, culminando com a morte dos parasitos. *In vitro*, o tratamento com NAC não resultou em alterações no crescimento de promastigotas ou de amastigotas em macrófagos (MONTEIRO *et al.*, 2008).

Assim como nós, alguns autores também tem sugerido que o estresse oxidativo é importante para a proliferação do *T. cruzi* (NOGUEIRA *et al.*, 2011; PAIVA *et al.*, 2012). Estudos mostraram que parasitos submetidos a baixas concentrações de H₂O₂ desenvolvem uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo causado pelas células hospedeiras, o que resulta na preservação da integridade de seu conteúdo genético e aumento de sua capacidade replicativa sob condições de estresse (AGUIAR *et al.*, 2013). Em epimastigotas de *T. cruzi*, o tratamento com baixas concentrações de H₂O₂ estimulou a proliferação dos parasitos, induzindo um aumento nos níveis da enzima antioxidante CPX, preparando o parasito para lidar melhor com o estresse oxidativo encontrado posteriormente (FINZI *et al.*, 2004). Esse mesmo trabalho mostrou que parasitos previamente tratados com uma dose subletal de H₂O₂ tornam-se mais resistentes a um tratamento posterior com doses maiores deste oxidante (FINZI *et al.*, 2004). Pesquisadores demonstraram anteriormente que o grupo heme é capaz de induzir a proliferação de epimastigotas *in vitro* de maneira dose-dependente (LARA *et al.*, 2007) e que esse crescimento é associado com a atividade da cinase dependente de cálcio/calmodulina II (CaMKII) (SOUZA *et al.*, 2009). Posteriormente, esse mesmo grupo demonstrou que o grupo heme induz uma condição de estresse oxidativo transitória que estimula o crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* em um mecanismo dependente de CaMKII

(NOGUEIRA *et al.*, 2011). Paiva e colaboradores demonstraram que o estresse oxidativo gerado em resposta a infecção com a cepa Y de *T. cruzi* contribui para a manutenção da alta carga parasitária em macrófagos (PAIVA *et al.*, 2012). Além disso, o tratamento com antioxidantes inibiu a proliferação de epimastigotas de *T. cruzi in vitro* (NOGUEIRA *et al.*, 2011) e reduziu os níveis de parasitemia e mortalidade em camundongos BALB/c (GUEVARA *et al.*, 2000). Recentemente foi publicado que o tratamento com antioxidantes realmente inibe a proliferação de epimastigotas *in vitro* mas estimula o processo de metaciclogênese no *T. cruzi*. O tratamento com os antioxidantes GSH, NAC e urato induziu um aumento no número de formas tripomastigotas e reduziu a quantidade de epimastigotas em experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* utilizando-se triatomíneos. Por sua vez, o tratamento com os oxidantes H₂O₂ e paraquat (gerador de O₂^{•-}) induziu aumento na proliferação de formas epimastigotas (NOGUEIRA *et al.*, 2015). Em conjunto, esses dados reforçam a hipótese de que um sinal oxidante é necessário para o crescimento dos parasitos.

É pouco provável que o O₂^{•-} seja a espécie reativa de oxigênio responsável pelos eventos de sinalização em *T. cruzi*, devido à sua natureza aniônica e capacidade restrita de atravessar membranas, o que dificultaria a exposição do parasito a essa molécula. Por outro lado, o H₂O₂ é um oxidante com alta capacidade de difusão. Neste trabalho, mostramos que o parasitismo pode ser recuperado quando macrófagos Phox KO ou macrófagos tratados com antioxidantes são submetidos ao tratamento com H₂O₂ antes da infecção. O tratamento dos parasitos com H₂O₂ antes da infecção também induziu a recuperação da capacidade replicativa em células deficientes na produção de ROS. Outra evidência de que o H₂O₂ poderia ser o sinal responsável pela replicação do parasito é que o tratamento

de macrófagos com catalase, uma enzima antioxidante que promove a detoxificação do H_2O_2 , também resultou na redução do parasitismo. Em conjunto, esses resultados indicam que o H_2O_2 pode ser o sinal responsável pela replicação do *T. cruzi* em macrófagos.

Nas décadas de 70 e 80, o parasito *T. cruzi* era considerado um organismo particularmente susceptível a ação de moléculas oxidantes, como $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e $\bullet OH$, devido à ausência da enzima catalase e do pouco conhecimento relacionado às defesas antioxidantes dos tripanosomatídeos (DOCAMPO; MORENO, 1984).

Em contraste com todos os outros eucariotos, os tripanosomatídeos não possuem a enzima catalase (exceto *Crythidia fasciculata*) e acreditava-se que as glutathione peroxidases também eram ausentes. Entretanto, posteriormente foram identificadas cinco peroxidases neste parasito, demonstrando que o *T. cruzi* possui um sistema bastante complexo e efetivo para lidar com o estresse oxidativo, em contraste com os relatos anteriores (BOIANI *et al.*, 2010). O sistema antioxidante do *T. cruzi* constitui um mecanismo de defesa importante para o parasito lidar com as ROS produzidas durante a infecção por células como macrófagos e cardiomiócitos, além de auxiliar na correção de danos provenientes do estresse oxidativo. A presença de catalase neste parasito poderia, por sua vez, prejudicar o sinal para resistência ao dano oxidativo, uma vez que potencializaria o efeito das peroxidases na remoção do H_2O_2 .

Modulações na expressão da enzima catalase têm sido descritas para células cancerosas. Alguns pesquisadores têm demonstrado que células de melanoma apresentam alterações no sistema antioxidante quando comparadas à melanócitos normais (MEYSKENS, Jr. *et al.*, 2001; PICARDO *et al.*, 1996). Essas

células apresentaram níveis de atividade aumentados da enzima SOD e redução na atividade da enzima catalase, sugerindo a presença constante de estresse oxidativo em melanomas (PICARDO *et al.*, 1996). Diferenças nos níveis de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 entre melanócitos normais e células de melanoma também foram relatadas. A produção de $O_2^{\bullet-}$ em células de melanoma aumenta aproximadamente quatro vezes em comparação ao melanócitos, enquanto que a produção de H_2O_2 é 43% menor (MEYSKENS, Jr. *et al.*, 2001). A superexpressão de catalase em um modelo murino de câncer de mama diminui consideravelmente o caráter invasivo do tumor e também a severidade de metástases. Uma explicação plausível para o efeito protetor da superexpressão de catalase neste modelo poderia ser o cancelamento de uma sinalização dependente de ROS necessária para a aquisição de um comportamento invasivo pelo tumor. As ROS geradas a partir de H_2O_2 , em concentrações subletais, poderiam atuar como um segundo mensageiro intracelular, aumentando a transcrição de diversos genes que induzem a proliferação de tumores (GOH *et al.*, 2011). Com o crescimento do tumor, as células tumorais encontram microambientes adversos, com baixas taxas de oxigenação (hipóxia), por exemplo. A resistência do tumor à hipóxia ocorre através da sinalização redox mitocondrial e está diretamente relacionada à invasividade do mesmo. A produção de $O_2^{\bullet-}$ pelo complexo mitocondrial III aumenta sob condições de baixa oxigenação. O $O_2^{\bullet-}$ é rapidamente convertido a H_2O_2 pela SODA mitocondrial. O H_2O_2 atravessa facilmente as membranas celulares e pode atuar como um sinalizador da mitocôndria para o citoplasma e espaço extracelular, afetando outros tipos de células. Além disso, o H_2O_2 estabiliza o fator de transcrição induzido por hipóxia HIF1-alfa, que leva à transcrição de genes que promovem o crescimento do tumor nestas condições inóspitas. Células tumorais que superexpressam catalase são

menos adaptadas a crescer em condições de hipóxia. A superexpressão da catalase atenua os efeitos do H_2O_2 , diminuindo a adaptação das células cancerosas aos ambientes de baixa oxigenação (ENNS; LADIGES, 2012). Em conjunto, esses resultados podem sugerir que, devido ao aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$ a expressão de SOD seja maior em células tumorais. A redução dos níveis de H_2O_2 nessas células poderia ser explicada pelo fato de que este oxidante estaria sendo removido através de outros sistemas ou enzimas. Poderíamos inclusive sugerir que as células tumorais diminuem a expressão da catalase para evitar a dismutação do H_2O_2 , que poderia então ser metabolizado por outras enzimas que produzem metabólitos secundários que sinalizam a presença de estresse oxidativo para outros sistemas. A dismutação do H_2O_2 pela catalase gera H_2O e O_2 , que não funcionam como moléculas sinalizadoras.

Como dito anteriormente, o *T. cruzi* não possui a enzima catalase e nossos dados sugerem que o H_2O_2 é uma molécula sinalizadora importante para a replicação deste parasito em macrófagos. Não se sabe ao certo porque o *T. cruzi* suprimiu a catalase, mas especulamos que essa enzima poderia ser prejudicial para a sinalização por H_2O_2 , envolvida no processo de multiplicação deste parasito. Além disso, assim como a célula cancerosa, o parasito pode ter suprimido a enzima catalase, por viver em um ambiente de estresse oxidativo e precisar da participação de enzimas antioxidantes que sinalizem para as outras vias que há uma situação de estresse.

Neste trabalho, mostramos que a superexpressão da enzima catalase de *E. coli* torna o parasito *T. cruzi* mais resistente, uma vez que sua multiplicação em macrófagos C57BL/6 WT é aumentada. Entretanto, esse parasito, EcCat, não apresenta a mesma capacidade de adaptação ao estresse oxidativo observada nos

parasitos TcWT e TcMTH. Quando comparamos o crescimento dos parasitos EcCat e TcWT tratados com H₂O₂ em macrófagos Phox KO, observamos que o fenômeno de sinalização é mais forte em parasitos TcWT, que aumentam o dobro de vezes seu crescimento em relação ao parasito EcCat. EcCat é um parasito resistente, mas que sofre menos adaptação ao estresse oxidativo. O crescimento de EcCat em macrófagos tratados com o antioxidante catalase não foi afetado, como o crescimento dos parasitos TcWT e TcMTH. Isso reforça nossa hipótese de que o parasito superexpressor da catalase diminui sua capacidade de adaptação às condições de estresse oxidativo, não sendo portanto, um parasito sinalizador. Além disso, resultados obtidos por outros pesquisadores do nosso grupo e que ainda não foram publicados, mostram que pré-tratamento de epimastigotas do parasito EcCat com H₂O₂ não aumenta sua resistência, mas aumenta a resistência dos parasitos TcWT e TcMTH.

O mecanismo exato pelo qual a baixa produção de oxidantes potencializa a infecção pelo *T. cruzi* permanece ainda por ser elucidado. Uma possibilidade é que as ROS poderiam promover a formação excessiva de 8-oxo-dGTP, que poderia ser hidrolisado pela enzima MutT, resultando na forma monofosfato 8-oxo-dGMP. Esta molécula poderia agir como um segundo mensageiro celular, indicando a presença de estresse oxidativo e preparando o parasito para lidar melhor com essa situação. A participação da via de reparo da 8-oxoG em eventos de sinalização celular foi descrita por Boldogh *et al* em células de mamíferos (BOLDOGH *et al.*, 2012). Neste estudo foi demonstrado que a 8-oxoG removida do DNA pela enzima OGG1, liga-se novamente a essa enzima com alta afinidade, em um sítio distinto do substrato. O complexo OGG1-8-oxoG interage com enzima GTPase Ras, capacitando-a a ativar diversas vias de sinalização, incluindo aquelas que modulam a expressão de

enzimas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo. Neste caso, além de participar da via de reparo da 8-oxoG, a OGG1 também atua em processos de sinalização celular, modulando a expressão de enzimas que previnem a incorporação de 8-oxoG no DNA, como a MTH1 (BOLDOGH *et al.*, 2012).

Como discutido, os resultados encontrados na literatura sobre o papel das ROS na infecção por *T. cruzi* são bastante contraditórios (PAIVA; BOZZA, 2014). Portanto, neste estudo, nós tentamos esclarecer a importância das ROS na infecção por esse parasito. Nossos resultados mostraram que parasitos modificados, mais resistentes às ROS, multiplicam-se melhor em macrófagos, mas que essa proliferação é significativamente reduzida quando a produção de ROS é inibida na célula hospedeira. Uma possível explicação seria o fato de que os parasitos precisam de níveis mínimos de ROS, que poderiam atuar como um sinal para sua replicação. Altos níveis de ROS, no entanto, são deletérios para o parasito, induzindo, por exemplo, danos em seu DNA. Nesse sentido, parasitos superexpressores de enzimas com atividade 8-oxo-GTPase poderiam ser sensibilizados e receber melhor o sinal da célula hospedeira para se multiplicarem e ao mesmo tempo, poderiam escapar melhor dos efeitos negativos induzidos por ROS, diminuindo a ocorrência de quebras na dupla fita de DNA e consequentemente minimizando lesões letais, aumentando sua capacidade replicativa.

Nossos resultados nos permitem especular que a maioria das tripomastigotas, ao infectar tecidos humanos, seriam eliminadas por altas concentrações de ROS. Entretanto, as poucas tripomastigotas que encontram baixas concentrações de oxidantes poderiam se tornar mais virulentas graças a essa exposição. Dessa forma, o estresse oxidativo desencadeado no hospedeiro vertebrado poderia contribuir para uma fase essencial do desenvolvimento do

parasito, tornando-o mais virulento e o preparando melhor para o estabelecimento da infecção.

6. Referências

AGUIAR, P. H.; FURTADO, C.; REPOLES, B. M.; RIBEIRO, G. A.; MENDES, I. C.; PELOSO, E. F.; GADELHA, F. R.; MACEDO, A. M.; FRANCO, G. R.; PENA, S. D.; TEIXEIRA, S. M.; VIEIRA, L. Q.; GUARNERI, A. A.; ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R. Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, v. 7, n. 6, p. e2279-2013

ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; PIACENZA, L.; RADI, R. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J.Biol.Chem.*, v. 286, n. 8, p. 6627-6640, 2011

ALVAREZ, M. N.; PIACENZA, L.; IRIGOIN, F.; PELUFFO, G.; RADI, R. Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Arch.Biochem.Biophys.*, v. 432, n. 2, p. 222-232, 2004

ALVES, M. J.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBMB.Life*, v. 59, n. 4-5, p. 274-279, 2007

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J.Exp.Med.*, v. 200, n. 9, p. 1135-1143, 2004

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat.Rev.Microbiol.*, v. 3, n. 10, p. 819-823, 2005

ANDREWS, N. W. From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, v. 27, n. 2, p. 471-475, 1994

ANDREWS, N. W. Oxidative stress and intracellular infections: more iron to the fire. *J.Clin.Invest*, v. 122, n. 7, p. 2352-2354, 2012

- ASSARI, T. Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD. *Med.Immunol.*, v. 5, n. 4-2006
- ATWOOD, J. A., III; WEATHERLY, D. B.; MINNING, T. A.; BUNDY, B.; CAVOLA, C.; OPPERDOES, F. R.; ORLANDO, R.; TARLETON, R. L. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*, v. 309, n. 5733, p. 473-476, 2005
- BABIOR, B. M. The respiratory burst of phagocytes. *J.Clin.Invest*, v. 73, n. 3, p. 599-601, 1984
- BARBOSA, H. S.; MEIRELLES, M. N. Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during the invasion of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Struct.Funct.*, v. 20, n. 4, p. 275-284, 1995
- BARNES, D. E.; LINDAHL, T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu.Rev.Genet.*, v. 38, n. 445-476, 2004
- BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, v. 40, n. 4, p. 405-412, 1991
- BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.*, v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007
- BERGERON, M.; BLANCHETTE, J.; ROULEAU, P.; OLIVIER, M. Abnormal IFN-gamma-dependent immunoproteasome modulation by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. *Parasite Immunol.*, v. 30, n. 5, p. 280-292, 2008

BERGERON, M.; OLIVIER, M. *Trypanosoma cruzi*-mediated IFN-gamma-inducible nitric oxide output in macrophages is regulated by iNOS mRNA stability. *J.Immunol.*, v. 177, n. 9, p. 6271-6280, 2006

BOIANI, M.; PIACENZA, L.; HERNANDEZ, P.; BOIANI, L.; CERECETTO, H.; GONZALEZ, M.; DENICOLA, A. Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved? *Biochem.Pharmacol.*, v. 79, n. 12, p. 1736-1745, 2010

BOLDOGH, I.; HAJAS, G.; AGUILERA-AGUIRRE, L.; HEGDE, M. L.; RADAK, Z.; BACSI, A.; SUR, S.; HAZRA, T. K.; MITRA, S. Activation of ras signaling pathway by 8-oxoguanine DNA glycosylase bound to its excision product, 8-oxoguanine. *J.Biol.Chem.*, v. 287, n. 25, p. 20769-20773, 2012

BOVERIS, A.; SIES, H.; MARTINO, E. E.; DOCAMPO, R.; TURRENS, J. F.; STOPPANI, A. O. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem.J.*, v. 188, n. 3, p. 643-648, 1980

BRANDES, R. P.; WEISSMANN, N.; SCHRODER, K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic.Biol.Med.*, v. 76, n. 208-226, 2014

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev.Inst Med.Trop.Sao Paulo*, v. 4, n. 389-396, 1962

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu.Rev.Microbiol.*, v. 27, n. 347-382, 1973

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu.Rev.Microbiol.*, v. 49, n. 175-200, 1995

CALVET, C. M.; MELO, T. G.; GARZONI, L. R.; OLIVEIRA, F. O., Jr.; NETO, D. T.; N S L M; MEIRELLES, L.; PEREIRA, M. C. Current understanding of the *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction. *Front Immunol.*, v. 3, n. 327-2012

CARDONI, R. L.; ANTUNEZ, M. I.; MORALES, C.; NANTES, I. R. Release of reactive oxygen species by phagocytic cells in response to live parasites in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v. 56, n. 3, p. 329-334, 1997

CASTOR, L. R.; LOCATELLI, K. A.; XIMENES, V. F. Pro-oxidant activity of apocynin radical. *Free Radic.Biol.Med.*, v. 48, n. 12, p. 1636-1643, 2010

CASTRO, D. P.; SEABRA, S. H.; GARCIA, E. S.; DE, Souza W.; AZAMBUJA, P. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. *Exp.Parasitol.*, v. 117, n. 2, p. 201-207, 2007

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC).

<http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/> (Acessado em 9 de janeiro de 2015).

CHAGAS C. Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homen. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 1, n. 159-218, 1909

CHENG, K. C.; CAHILL, D. S.; KASAI, H.; NISHIMURA, S.; LOEB, L. A. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A-- --C substitutions. *J.Biol.Chem.*, v. 267, n. 1, p. 166-172, 1992

COURA, J. R.; VINAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, v. 465, n. 7301, p. S6-S7, 2010

DALTON, D. K.; PITTS-MEEK, S.; KESHAV, S.; FIGARI, I. S.; BRADLEY, A.; STEWART, T. A. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science*, v. 259, n. 5102, p. 1739-1742, 1993

DANTAS, A. D.; DAY, A.; IKEH, M.; KOS, I.; ACHAN, B.; QUINN, J. Oxidative Stress Responses in the Human Fungal Pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules.*, v. 5, n. 1, p. 142-165, 2015

DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, v. 447, n. 7147, p. 941-950, 2007

DE CARVALHO, T. M.; DE, Souza W. Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell Struct.Funct.*, v. 14, n. 4, p. 383-392, 1989

DE, Souza W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int.J.Cell Biol.*, v. 2010, n. 2010

DHIMAN, M.; GARG, N. J. NADPH oxidase inhibition ameliorates *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis during Chagas disease. *J.Pathol.*, v. 225, n. 4, p. 583-596, 2011

DHIMAN, M.; GARG, N. J. P47phox^{-/-} mice are compromised in expansion and activation of CD8⁺ T cells and susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS.Pathog.*, v. 10, n. 12, p. e1004516-2014

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*.

Rev.Infect.Dis., v. 6, n. 2, p. 223-238, 1984

DOR, Y.; GLASER, B. beta-cell dedifferentiation and type 2 diabetes. *N.Engl.J.Med.*, v. 368, n. 6, p. 572-573, 2013

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.*, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.;
AGGARWAL, G.; TRAN, A. N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E. A.; DELCHER, A. L.;
BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S. J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G. C.;
BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.;
BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D. A.;
CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; DA SILVEIRA, J. F.; DE, Jong P.;
EDWARDS, K.; ENGLUND, P. T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.;
FRASCH, A. C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.;
KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M. J.; LORENZI, H.;
LOUIE, T.; MACHADO, C. R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.;
MOTTRAM, J. C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS,
M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J. L.; RINTA, J.;
ROBERTSON, L.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, D. O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.;
SHETTY, J.; SIMPSON, A. J.; SISK, E.; TAMMI, M. T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA,
S.; VAN, Aken S.; VOGT, C.; WARD, P. N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.;
WHITE, O.; FRASER, C. M.; STUART, K. D.; ANDERSSON, B. The genome

sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, v. 309, n. 5733, p. 409-415, 2005

ENNS, L.; LADIGES, W. Mitochondrial redox signaling and cancer invasiveness. *J.Bioenerg.Biomembr.*, v. 44, n. 6, p. 635-638, 2012

FERREIRA, D.; CORTEZ, M.; ATAYDE, V. D.; YOSHIDA, N. Actin cytoskeleton-dependent and -independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. *Infect.Immun.*, v. 74, n. 10, p. 5522-5528, 2006

FINZI, J. K.; CHIAVEGATTO, C. W.; CORAT, K. F.; LOPEZ, J. A.; CABRERA, O. G.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; COLLI, W.; ALVES, M. J.; GADELHA, F. R. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. *Mol.Biochem.Parasitol.*, v. 133, n. 1, p. 37-43, 2004

FRATERNALE, A.; PAOLETTI, M. F.; CASABIANCA, A.; NENCIONI, L.; GARACI, E.; PALAMARA, A. T.; MAGNANI, M. GSH and analogs in antiviral therapy. *Mol.Aspects Med.*, v. 30, n. 1-2, p. 99-110, 2009

FREIN, D.; SCHILDKNECHT, S.; BACHSCHMID, M.; ULLRICH, V. Redox regulation: a new challenge for pharmacology. *Biochem.Pharmacol.*, v. 70, n. 6, p. 811-823, 2005

GAD, H.; KOOLMEISTER, T.; JEMTH, A. S.; ESHTAD, S.; JACQUES, S. A.; STROM, C. E.; SVENSSON, L. M.; SCHULTZ, N.; LUNDBACK, T.; EINARSDOTTIR, B. O.; SALEH, A.; GOKTURK, C.; BARANCZEWSKI, P.; SVENSSON, R.; BERNTSSON, R. P.; GUSTAFSSON, R.; STROMBERG, K.; SANJIV, K.; JACQUES-CORDONNIER, M. C.; DESROSES, M.; GUSTAVSSON, A. L.; OLOFSSON, R.;

JOHANSSON, F.; HOMAN, E. J.; LOSEVA, O.; BRAUTIGAM, L.; JOHANSSON, L.; HOGLUND, A.; HAGENKORT, A.; PHAM, T.; ALTUN, M.; GAUGAZ, F. Z.; VIKINGSSON, S.; EVERS, B.; HENRIKSSON, M.; VALLIN, K. S.; WALLNER, O. A.; HAMMARSTROM, L. G.; WIITA, E.; ALMLOF, I.; KALDEREN, C.; AXELSSON, H.; DJUREINOVIC, T.; PUIGVERT, J. C.; HAGGBLAD, M.; JEPPSSON, F.; MARTENS, U.; LUNDIN, C.; LUNDGREN, B.; GRANELLI, I.; JENSEN, A. J.; ARTURSSON, P.; NILSSON, J. A.; STENMARK, P.; SCOBIE, M.; BERGLUND, U. W.; HELLEDAY, T. MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool. *Nature*, v. 508, n. 7495, p. 215-221, 2014

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur.J.Immunol.*, v. 22, n. 10, p. 2501-2506, 1992

GHOTI, H.; AMER, J.; WINDER, A.; RACHMILEWITZ, E.; FIBACH, E. Oxidative stress in red blood cells, platelets and polymorphonuclear leukocytes from patients with myelodysplastic syndrome. *Eur.J.Haematol.*, v. 79, n. 6, p. 463-467, 2007

GOH, J.; ENNS, L.; FATEMIE, S.; HOPKINS, H.; MORTON, J.; PETTAN-BREWER, C.; LADIGES, W. Mitochondrial targeted catalase suppresses invasive breast cancer in mice. *BMC.Cancer*, v. 11, n. 191-2011

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal.Biochem.*, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982

GRIENGLING, K. K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ.Res.*, v. 86, n. 5, p. 494-501, 2000

GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem.J.*, v. 386, n. Pt 3, p. 401-416, 2005

GUEVARA, A. G.; GUILVARD, E.; BORGES, M. M.; CORDEIRO DA, Silva A.; OUAISSI, A. N-Acetylcysteine and glutathione modulate the behaviour of *Trypanosoma cruzi* experimental infection. *Immunol.Lett.*, v. 71, n. 2, p. 79-83, 2000

GUPTA, S.; BHATIA, V.; WEN, J. J.; WU, Y.; HUANG, M. H.; GARG, N. J. *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free Radic.Biol.Med.*, v. 47, n. 10, p. 1414-1421, 2009

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br.J.Pharmacol.*, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004

HISSA, B.; DUARTE, J. G.; KELLES, L. F.; SANTOS, F. P.; DEL PUERTO, H. L.; GAZZINELLI-GUIMARAES, P. H.; DE PAULA, A. M.; AGERO, U.; MESQUITA, O. N.; GUATIMOSIM, C.; CHIARI, E.; ANDRADE, L. O. Membrane cholesterol regulates lysosome-plasma membrane fusion events and modulates *Trypanosoma cruzi* invasion of host cells. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, v. 6, n. 3, p. e1583-2012

HSU, G. W.; OBER, M.; CARELL, T.; BEESE, L. S. Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase. *Nature*, v. 431, n. 7005, p. 217-221, 2004

JAEGER, T.; FLOHE, L. The thiol-based redox networks of pathogens: unexploited targets in the search for new drugs. *Biofactors*, v. 27, n. 1-4, p. 109-120, 2006

JIANG, F.; LIM, H. K.; MORRIS, M. J.; PRIOR, L.; VELKOSKA, E.; WU, X.; DUSTING, G. J. Systemic upregulation of NADPH oxidase in diet-induced obesity in rats. *Redox.Rep.*, v. 16, n. 6, p. 223-229, 2011

JIMENEZ-LOPEZ, C.; COLLETTE, J. R.; BROTHERS, K. M.; SHEPARDSON, K. M.; CRAMER, R. A.; WHEELER, R. T.; LORENZ, M. C. *Candida albicans* induces arginine biosynthetic genes in response to host-derived reactive oxygen species. *Eukaryot.Cell*, v. 12, n. 1, p. 91-100, 2013

JUNG, J. Y.; MADAN-LALA, R.; GEORGIEVA, M.; RENGARAJAN, J.; SOHASKEY, C. D.; BANGE, F. C.; ROBINSON, C. M. The intracellular environment of human macrophages that produce nitric oxide promotes growth of mycobacteria. *Infect.Immun.*, v. 81, n. 9, p. 3198-3209, 2013

KIERSZENBAUM, F.; KNECHT, E.; BUDZKO, D. B.; PIZZIMENTI, M. C. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. *J.Immunol.*, v. 112, n. 5, p. 1839-1844, 1974

KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol.Today*, v. 16, n. 9, p. 381-387, 2000

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; BAUER, H.; SCHIRMER, R. H. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.*, v. 44, n. 5, p. 690-715, 2005

- KRAUTH-SIEGEL, R. L.; COMINI, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1780, n. 11, p. 1236-1248, 2008
- LARA, F. A.; SANT'ANNA, C.; LEMOS, D.; LARANJA, G. A.; COELHO, M. G.; REIS, Salles, I; MICHEL, A.; OLIVEIRA, P. L.; CUNHA-E-SILVA; SALMON, D.; PAES, M. C. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 355, n. 1, p. 16-22, 2007
- LAROUX, F. S.; ROMERO, X.; WETZLER, L.; ENGEL, P.; TERHORST, C. Cutting edge: MyD88 controls phagocyte NADPH oxidase function and killing of gram-negative bacteria. *J.Immunol.*, v. 175, n. 9, p. 5596-5600, 2005
- LETO, T. L.; ADAMS, A. G.; DE, MENDEZ, I. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 91, n. 22, p. 10650-10654, 1994
- LIU, G. S.; CHAN, E. C.; HIGUCHI, M.; DUSTING, G. J.; JIANG, F. Redox mechanisms in regulation of adipocyte differentiation: beyond a general stress response. *Cells*, v. 1, n. 4, p. 976-993, 2012
- MATEO, H.; MARIN, C.; PEREZ-CORDON, G.; SANCHEZ-MORENO, M. Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 3, p. 271-276, 2008
- MCCABE, R. E.; MULLINS, B. T. Failure of *Trypanosoma cruzi* to trigger the respiratory burst of activated macrophages. Mechanism for immune evasion and

importance of oxygen-independent killing. *J.Immunol.*, v. 144, n. 6, p. 2384-2388, 1990

MEYSKENS, F. L., Jr.; MCNULTY, S. E.; BUCKMEIER, J. A.; TOHIDIAN, N. B.; SPILLANE, T. J.; KAHLON, R. S.; GONZALEZ, R. I. Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes. *Free Radic.Biol.Med.*, v. 31, n. 6, p. 799-808, 2001

MICHAELS, M. L.; MILLER, J. H. The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *J.Bacteriol.*, v. 174, n. 20, p. 6321-6325, 1992

MITTRA, B.; CORTEZ, M.; HAYDOCK, A.; RAMASAMY, G.; MYLER, P. J.; ANDREWS, N. W. Iron uptake controls the generation of *Leishmania* infective forms through regulation of ROS levels. *J.Exp.Med.*, v. 210, n. 2, p. 401-416, 2013

MIZRAHI, A.; BERDICHEVSKY, Y.; UGOLEV, Y.; MOLSHANSKI-MOR, S.; NAKASH, Y.; DAHAN, I.; ALLOUL, N.; GORZALCZANY, Y.; SARFSTEIN, R.; HIRSHBERG, M.; PICK, E. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase complex: chimeric constructs derived from the cytosolic components as tools for exploring structure-function relationships. *J.Leukoc.Biol.*, v. 79, n. 5, p. 881-895, 2006

MOLINA, H. A.; KIERSZENBAUM, F. A study of human myocardial tissue in Chagas' disease: distribution and frequency of inflammatory cell types. *Int.J.Parasitol.*, v. 17, n. 7, p. 1297-1305, 1987

MOLINA, H. A.; MILEI, J.; RIMOLDI, M. T.; GONZALEZ CAPPA, S. M.; STORINO, R. A. Histopathology of the heart conducting system in experimental Chagas disease in mice. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, v. 82, n. 2, p. 241-246, 1988

MONTEIRO, M. C.; MARQUES, F. C.; BLAZIUS, R. D.; SANTOS DA, Silva O.; DE QUEIROZ, Cunha F.; BENTO, D. B.; TORRES ROMAO, P. R. N-acetyl-L: -cysteine reduces the parasitism of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Parasitol.Res.*, v. 102, n. 4, p. 801-803, 2008

MOORE, M. K.; VISELLI, S. M. Staining and quantification of proteins transferred to polyvinylidene fluoride membranes. *Anal.Biochem.*, v. 279, n. 2, p. 241-242, 2000

MUNOZ-FERNANDEZ, M. A.; FERNANDEZ, M. A.; FRESNO, M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol.Lett.*, v. 33, n. 1, p. 35-40, 1992

MURRAY, H. W. Pretreatment with phorbol myristate acetate inhibits macrophage activity against intracellular protozoa. *J.Reticuloendothel.Soc.*, v. 31, n. 6, p. 479-487, 1982

NATHAN, C.; NOGUEIRA, N.; JUANGBHANICH, C.; ELLIS, J.; COHN, Z. Activation of macrophages in vivo and in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. *J.Exp.Med.*, v. 149, n. 5, p. 1056-1068, 1979

NEELEY, W. L.; ESSIGMANN, J. M. Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chem.Res.Toxicol.*, v. 19, n. 4, p. 491-505, 2006

NOGUEIRA, N.; COHN, Z. A. *Trypanosoma cruzi*: in vitro induction of macrophage microbicidal activity. *J.Exp.Med.*, v. 148, n. 1, p. 288-300, 1978

NOGUEIRA, N. P.; DE SOUZA, C. F.; SARAIVA, F. M.; SULTANO, P. E.; DALMAU, S. R.; BRUNO, R. E.; GONCALVES, Rde L.; LARANJA, G. A.; LEAL, L. H.; COELHO, M. G.; MASUDA, C. A.; OLIVEIRA, M. F.; PAES, M. C. Heme-induced ROS in *Trypanosoma cruzi* activates CaMKII-like that triggers epimastigote proliferation. One helpful effect of ROS. *PLoS.One.*, v. 6, n. 10, p. e25935-2011

NOGUEIRA, N. P.; SARAIVA, F. M.; SULTANO, P. E.; CUNHA, P. R.; LARANJA, G. A.; JUSTO, G. A.; SABINO, K. C.; COELHO, M. G.; ROSSINI, A.; ATELLA, G. C.; PAES, M. C. Proliferation and Differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside Its Vector Have a New Trigger: Redox Status. *PLoS.One.*, v. 10, n. 2, p. e0116712-2015

OBERLEY-DEEGAN, R. E.; REBITS, B. W.; WEAVER, M. R.; TOLLEFSON, A. K.; BAI, X.; MCGIBNEY, M.; OVRUTSKY, A. R.; CHAN, E. D.; CRAPO, J. D. An oxidative environment promotes growth of *Mycobacterium abscessus*. *Free Radic.Biol.Med.*, v. 49, n. 11, p. 1666-1673, 2010

PAES, M. C.; OLIVEIRA, M. B.; OLIVEIRA, P. L. Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. *Arch.Insect Biochem.Physiol*, v. 48, n. 2, p. 63-71, 2001

PAIVA, C. N.; BOZZA, M. T. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? *Antioxid.Redox.Signal.*, v. 20, n. 6, p. 1000-1037, 2014

PAIVA, C. N.; FEIJO, D. F.; DUTRA, F. F.; CARNEIRO, V. C.; FREITAS, G. B.; ALVES, L. S.; MESQUITA, J.; FORTES, G. B.; FIGUEIREDO, R. T.; SOUZA, H. S.;

FANTAPPIE, M. R.; LANNES-VIEIRA, J.; BOZZA, M. T. Oxidative stress fuels

Trypanosoma cruzi infection in mice. *J.Clin.Invest*, v. 122, n. 7, p. 2531-2542, 2012

PANDAY, A.; SAHOO, M. K.; OSORIO, D.; BATRA, S. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell*

Mol.Immunol., v. 12, n. 1, p. 5-23, 2015

PARODI-TALICE, A.; MONTEIRO-GOES, V.; ARRAMBIDE, N.; AVILA, A. R.;

DURAN, R.; CORREA, A.; DALLAGIOVANNA, B.; CAYOTA, A.; KRIEGER, M.;

GOLDENBERG, S.; ROBELLO, C. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *J.Mass Spectrom.*, v. 42, n. 11, p. 1422-1432, 2007

PIACENZA, L.; ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; RADII, R. Fighting the oxidative

assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Curr.Opin.Microbiol.*, v. 12, n. 4, p. 415-421, 2009a

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; KELLY, J. M.; WILKINSON, S. R.;

RADII, R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem.J.*, v. 410, n. 2, p.

359-368, 2008

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; MARTINEZ, A.; RADII, R.

Trypanosoma cruzi antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease.

Antioxid.Redox.Signal., v. 19, n. 7, p. 723-734, 2013

PIACENZA, L.; ZAGO, M. P.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; BASOMBRIIO, M. A.;
RADI, R. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma*
cruzi virulence. *Int.J.Parasitol.*, v. 39, n. 13, p. 1455-1464, 2009b

PICARDO, M.; GRAMMATICO, P.; ROCCELLA, F.; ROCCELLA, M.; GRANDINETTI,
M.; DEL, Porto G.; PASSI, S. Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells
and normal melanocytes from patients with melanoma. *J.Invest Dermatol.*, v. 107, n.
3, p. 322-326, 1996

POLLOCK, J. D.; WILLIAMS, D. A.; GIFFORD, M. A.; LI, L. L.; DU, X.; FISHERMAN,
J.; ORKIN, S. H.; DOERSCHUK, C. M.; DINAUER, M. C. Mouse model of X-linked
chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide
production. *Nat.Genet.*, v. 9, n. 2, p. 202-209, 1995

PROCOPIO, D. O.; BARROS, H. C.; MORTARA, R. A. Actin-rich structures formed
during the invasion of cultured cells by infective forms of *Trypanosoma cruzi*.
Eur.J.Cell Biol., v. 78, n. 12, p. 911-924, 1999

PROLO, C.; ALVAREZ, M. N.; RADI, R. Peroxynitrite, a potent macrophage-derived
oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens. *Biofactors*, v. 40, n. 2, p. 215-225,
2014

QIAO, M.; ZHAO, Q.; LEE, C. F.; TANNOCK, L. R.; SMART, E. J.; LEBARON, R. G.;
PHELIX, C. F.; RANGEL, Y.; ASMIS, R. Thiol oxidative stress induced by metabolic
disorders amplifies macrophage chemotactic responses and accelerates
atherogenesis and kidney injury in LDL receptor-deficient mice.
Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol., v. 29, n. 11, p. 1779-1786, 2009

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

REED, S. G.; NATHAN, C. F.; PIHL, D. L.; RODRICKS, P.; SHANEBECK, K.; CONLON, P. J.; GRABSTEIN, K. H. Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. Comparison with interferon gamma. *J.Exp.Med.*, v. 166, n. 6, p. 1734-1746, 1987

REZENDE, T. M.; VARGAS, D. L.; CARDOSO, F. P.; SOBRINHO, A. P.; VIEIRA, L. Q. Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. *Int.Endod.J.*, v. 38, n. 12, p. 896-903, 2005

RHEE, S. G. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*, v. 312, n. 5782, p. 1882-1883, 2006

RODRIGUEZ, A.; MARTINEZ, I.; CHUNG, A.; BERLOT, C. H.; ANDREWS, N. W. cAMP regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. *J.Biol.Chem.*, v. 274, n. 24, p. 16754-16759, 1999

ROSESTOLATO, C. T.; DUTRA, Jda M.; DE, Souza W.; DE CARVALHO, T. M. Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell Struct.Funct.*, v. 27, n. 2, p. 91-98, 2002

RUDOLPH, T. K.; FREEMAN, B. A. Transduction of redox signaling by electrophile-protein reactions. *Sci.Signal.*, v. 2, n. 90, p. re7-2009

RYTER, S. W.; TYRRELL, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties.

Free Radic.Biol.Med., v. 28, n. 2, p. 289-309, 2000

SANTIAGO, H. C.; GONZALEZ LOMBANA, C. Z.; MACEDO, J. P.; UTSCH, L.;

TAFURI, W. L.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ALVES, R. O.; ALVES-FILHO, J.

C.; ROMANHA, A. J.; CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M. M.; RADY, R.; VIEIRA, L. Q.

NADPH phagocyte oxidase knockout mice control *Trypanosoma cruzi* proliferation,

but develop circulatory collapse and succumb to infection. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, v. 6,

n. 2, p. e1492-2012

SARSOUR, E. H.; KUMAR, M. G.; CHAUDHURI, L.; KALEN, A. L.; GOSWAMI, P. C.

Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxid.Redox.Signal.*, v. 11, n.

12, p. 2985-3011, 2009

SCHMITT, T. H.; FREZZATTI, W. A., Jr.; SCHREIER, S. Hemin-induced lipid

membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the

mechanism of cell lysis. *Arch.Biochem.Biophys.*, v. 307, n. 1, p. 96-103, 1993

SHAMES, S. L.; FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A.; WALSH, C. T. Purification and

characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*, a newly

discovered member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases.

Biochemistry, v. 25, n. 12, p. 3519-3526, 1986

SINGAL, P. K.; KHAPER, N.; FARAHMAND, F.; BELLO-KLEIN, A. Oxidative stress

in congestive heart failure. *Curr.Cardiol.Rep.*, v. 2, n. 3, p. 206-211, 2000

SOUZA, C. F.; CARNEIRO, A. B.; SILVEIRA, A. B.; LARANJA, G. A.; SILVA-NETO, M. A.; COSTA, S. C.; PAES, M. C. Heme-induced *Trypanosoma cruzi* proliferation is mediated by CaM kinase II. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 390, n. 3, p. 541-546, 2009

STRUTHERS, L.; PATEL, R.; CLARK, J.; THOMAS, S. Direct detection of 8-oxodeoxyguanosine and 8-oxoguanine by avidin and its analogues. *Anal.Biochem.*, v. 255, n. 1, p. 20-31, 1998a

STRUTHERS, L.; PATEL, R.; CLARK, J.; THOMAS, S. Direct detection of 8-oxodeoxyguanosine and 8-oxoguanine by avidin and its analogues. *Anal.Biochem.*, v. 255, n. 1, p. 20-31, 1998b

TALCHAI, C.; XUAN, S.; LIN, H. V.; SUSSEL, L.; ACCILI, D. Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure. *Cell*, v. 150, n. 6, p. 1223-1234, 2012

TANAKA, Y.; TANOWITZ, H.; BLOOM, B. R. Growth of *Trypanosoma cruzi* in a cloned macrophage cell line and in a variant defective in oxygen metabolism. *Infect.Immun.*, v. 41, n. 3, p. 1322-1331, 1983

TAVAKOLI, S.; ASMIS, R. Reactive oxygen species and thiol redox signaling in the macrophage biology of atherosclerosis. *Antioxid.Redox.Signal.*, v. 17, n. 12, p. 1785-1795, 2012

TODOROV, A. G.; EINICKER-LAMAS, M.; DE CASTRO, S. L.; OLIVEIRA, M. M.; GUILHERME, A. Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. *J.Biol.Chem.*, v. 275, n. 41, p. 32182-32186, 2000

TOMLINSON, S.; VANDEKERCKHOVE, F.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, V. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology*, v. 110 (Pt 5), n. 547-554, 1995

TRACHOOTHAM, D.; LU, W.; OGASAWARA, M. A.; NILSA, R. D.; HUANG, P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid.Redox.Signal.*, v. 10, n. 8, p. 1343-1374, 2008

TRUJILLO, M.; BUDDE, H.; PINEYRO, M. D.; STEHR, M.; ROBELLO, C.; FLOHE, L.; RADI, R. *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J.Biol.Chem.*, v. 279, n. 33, p. 34175-34182, 2004

TUNG, W. H.; HSIEH, H. L.; YANG, C. M. Enterovirus 71 induces COX-2 expression via MAPKs, NF-kappaB, and AP-1 in SK-N-SH cells: Role of PGE(2) in viral replication. *Cell Signal.*, v. 22, n. 2, p. 234-246, 2010

VLAHOS, R.; STAMBAS, J.; BOZINOVSKI, S.; BROUGHTON, B. R.; DRUMMOND, G. R.; SELEMIDIS, S. Inhibition of Nox2 oxidase activity ameliorates influenza A virus-induced lung inflammation. *PLoS.Pathog.*, v. 7, n. 2, p. e1001271-2011

WEN, J. J.; GARG, N. Oxidative modification of mitochondrial respiratory complexes in response to the stress of *Trypanosoma cruzi* infection. *Free Radic.Biol.Med.*, v. 37, n. 12, p. 2072-2081, 2004

WEN, J. J.; GARG, N. J. Mitochondrial generation of reactive oxygen species is enhanced at the Q(o) site of the complex III in the myocardium of *Trypanosoma*

cruzi-infected mice: beneficial effects of an antioxidant. *J.Bioenerg.Biomembr.*, v. 40, n. 6, p. 587-598, 2008

WHITTEN, M.; SUN, F.; TEW, I.; SCHAUB, G.; SOUKOU, C.; NAPPI, A.; RATCLIFFE, N. Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components. *Insect Biochem.Mol.Biol.*, v. 37, n. 5, p. 440-452, 2007

WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert.Rev.Mol.Med.*, v. 11, n. e31-2009

WILKINSON, S. R.; MEYER, D. J.; KELLY, J. M. Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. *Biochem.J.*, v. 352 Pt 3, n. 755-761, 2000

WILKINSON, S. R.; MEYER, D. J.; TAYLOR, M. C.; BROMLEY, E. V.; MILES, M. A.; KELLY, J. M. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. *J.Biol.Chem.*, v. 277, n. 19, p. 17062-17071, 2002a

WILKINSON, S. R.; OBADO, S. O.; MAURICIO, I. L.; KELLY, J. M. *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 99, n. 21, p. 13453-13458, 2002b

WILKINSON, S. R.; OBADO, S. O.; MAURICIO, I. L.; KELLY, J. M. *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the

endoplasmic reticulum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 99, n. 21, p. 13453-13458, 2002c

WILKINSON, S. R.; TAYLOR, M. C.; TOUITHA, S.; MAURICIO, I. L.; MEYER, D. J.; KELLY, J. M. TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. *Biochem.J.*, v. 364, n. Pt 3, p. 787-794, 2002d

WILKINSON, S. R.; TEMPERTON, N. J.; MONDRAGON, A.; KELLY, J. M. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J.Biol.Chem.*, v. 275, n. 11, p. 8220-8225, 2000

WILSON, M. E.; ANDERSEN, K. A.; BRITIGAN, B. E. Response of *Leishmania chagasi* promastigotes to oxidant stress. *Infect.Immun.*, v. 62, n. 11, p. 5133-5141, 1994

WOLFF, S. P. Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br.Med.Bull.*, v. 49, n. 3, p. 642-652, 1993

WOOLSEY, A. M.; SUNWOO, L.; PETERSEN, C. A.; BRACHMANN, S. M.; CANTLEY, L. C.; BURLEIGH, B. A. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J.Cell Sci.*, v. 116, n. Pt 17, p. 3611-3622, 2003

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. 2010

ZHOU, F. L.; ZHANG, W. G.; WEI, Y. C.; MENG, S.; BAI, G. G.; WANG, B. Y.;
YANG, H. Y.; TIAN, W.; MENG, X.; ZHANG, H.; CHEN, S. P. Involvement of
oxidative stress in the relapse of acute myeloid leukemia. *J.Biol.Chem.*, v. 285, n. 20,
p. 15010-15015, 2010