



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ROSIANE VALERIANO DA SILVA

DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL:
RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM
Phytomonas serpens E ANÁLISE DA SIMILARIDADE DE
CISTEÍNA PROTEASE DO FITOPATÓGENO COM
CRUZIPAÍNA DE *Trypanosoma cruzi*

ROSIANE VALERIANO DA SILVA

DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL:
RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM
Phytomonas serpens E ANÁLISE DA SIMILARIDADE DE
CISTEÍNA PROTEASE DO FITOPATÓGENO COM
CRUZIPAÍNA DE *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Departamento de Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Phileno Pinge Filho.
Co-orientadora: Prof^a Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Londrina
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Silva, Rosiane Valeriano.

Doença de Chagas Experimental: Resposta Imune de Camundongos Imunizados com *Phytomonas serpens* e análise da similaridade de cisteína protease do fitopatógeno com cruzipáina de *Trypanosoma cruzi* / Rosiane Valeriano Silva. - Londrina, 2015. 88 f. : il.

Orientador: Phileo Pinge Filho.

Coorientador: Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Citocinas, Óxido Nítrico, *Phytomonas serpens*, *Trypanosoma cruzi* - Tese. I. Pinge Filho, Phileo. II. Yamada Ogatta, Sueli Fumie. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

ROSIANE VALERIANO DA SILVA

DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL:
RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM
Phytomonas serpens E ANÁLISE DA SIMILARIDADE DE CISTEÍNA
PROTEASE DO FITOPATÓGENO COM CRUZIPAÍNA DE
Trypanosoma cruzi

Tese apresentada ao Departamento de Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Phileo Pinge Filho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dra. Pryscilla Fanini Wowk
Instituto Carlos Chagas – ICC/Fiocruz-PR

Prof^a. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dra. Ivete Conchon Costa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 06 de março de 2015.

APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico (CNPq)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
de Nível Superior (CAPES)

Fundação Araucária

Dedico este trabalho aos meus pais Manoel “*in memoriam*”
e Maria, aos meus irmãos Roseli e Adriano, a minha
sobrinha Mariane, com muito amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus por seu infinito amor e misericórdia, pela graça de realizar este trabalho.

Aos meus familiares, mamãe, papai, Adriano, Roseli e Mariane por todo incentivo, amor e compreensão, vocês são os responsáveis por tudo o que sou!

À Universidade Estadual de Londrina, ao Centro de Ciências Biológicas e ao Departamento de Ciências Patológicas e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Patológicas.

Em especial ao Prof. Dr. Phileno Pinge Filho por toda confiança, amizade e profissionalismo. Agradeço a oportunidade de compartilhar seu conhecimento.

À Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada-Ogatta e à Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni, por abrirem as portas de seu laboratório e compartilharem de seu conhecimento, obrigada por toda paciência e auxílio na realização deste trabalho.

Aos Professores Dr. Maurílio José Soares, Dr. Stenio Perdigão Fragoso, Dra. Pryscilla Fanini Wowk, Ms. Priscila Hiraiwa, e ao Ms. Cassiano Martin Batista do Instituto Carlos Chagas-Fiocruz-Curitiba, por toda ajuda e colaboração para realização deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunopatologia Experimental Aparecida Malvezi, Vera Tatakihara, Nágela Ghabdan Zanluqui, Maria Isabel Lovo Martins Busch Pereira, Rafael de Freitas, Sandra Lonien, Luana Consentini, Tiemi Suzukawa, Fernando Fernandes e Tassiane Rodriguês, pela inestimável ajuda durante a realização deste trabalho, muito obrigada por toda a paciência e compreensão.

À todos os amigos do NIP V, em especial a Daniele Kian, César Contreras, Alexandre Morey, Eliandro Tavares, Virgínia Prezzi e Jussevânia Pereira, pela colaboração nos experimentos, paciência e carinho em me ensinarem sempre que precisei e ao Técnico Ediel Clementino da Costa pela disposição em me ajudar sempre que precisei.

Aos técnicos de laboratório Jesus Antônio Vargas, Pedro Sebastião Dionízio, Irene Maria da Silva, Adernaldo dos Santos pela disponibilidade, colaboração e amizade.

Ao meu namorado Yuri, por seu carinho, amor, atenção e toda paciência nos momentos de estresse e ansiedade, te amo!

Aos meus amigos irmãos Isadora Zanzarini, Lays Kaneno, Leonardo Medeiros e Marco Antônio Lima, obrigada por me aturarem e mostrar sempre que tudo vale a pena, vocês são incríveis!

Aos colegas de Curso pela amizade, troca de conhecimento e apoio mútuo.

Aos animais, que com suas vidas, contribuíram para a realização deste trabalho.

Às Agências Financiadoras; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/ CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq, Programa de Apoio a núcleos de Excelência/Fundação Araucária.

Muito Obrigada.

“... Sonhe com aquilo que você quer ser,

Porque você possui apenas uma vida
E nela só se tem uma chance
De fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-las forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas.
Elas sabem fazer o mais das oportunidades
Que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
A importância das pessoas que passaram por suas vidas...”

Clarice Lispector

SILVA, Rosiane Valeriano da. **Doença de Chagas Experimental**: resposta imune de camundongos imunizados com *Phytomonas serpens* e análise da similaridade de cisteína protease do fitopatógeno com cruzipaína de *Trypanosoma cruzi*. 2015. 88 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Phytomonas serpens é um parasito de planta que compartilha antígenos com *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença Chagas. Estes antígenos são reconhecidos por soro humano de paciente chagásicos e são capazes de induzir imunidade protetora em camundongos, diminuindo as alterações hematológicas observadas na fase aguda da infecção. No presente estudo, avaliamos os efeitos da imunização intraperitoneal com *Phytomonas serpens* 15T sobre a fase aguda da infecção por *Trypanosoma cruzi*. Observamos aumento dos níveis de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-12 no plasma dos animais imunizados e infectados. Este aumento de citocinas pró-inflamatórias culminou com o aumento do NO no plasma e também no tecido cardíaco desses animais, resultado também em diminuição do parasitismo cardíaco. Em adição, avaliamos a possível similaridade entre a principal cisteína protease de *Trypanosoma cruzi*, cruzipaína, em *Phytomonas serpens* 15T. Utilizando o mAb CZP-315.D9 (anticorpo anti-cruzipaína), foi possível observar que as formas promastigotas de *Phytomonas serpens* 15T não possuem similaridades com a cisteína protease de *Trypanosoma cruzi*, um dos principais fatores de virulência do protozoário causador do doença de Chagas. Nossos dados reforçam a possibilidade de utilização de tripanossomatídeos de plantas como uma fonte segura de agente imunogênico para o tratamento e prevenção da doença de Chagas.

Palavras-chave: Cisteína Protease. Citocinas. Óxido Nítrico. *Phytomonas serpens*. *Trypanosoma cruzi*.

SILVA, Rosiane Valeriano da. **Experimental Chagas disease:** immune response of mice immunized with *Phytomonas serpens* and analysis of the similarity of the fitopathogen with cysteine protease cruzipain of *Trypanosoma cruzi*. 2015. 88 p. Thesis (Doctoral Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Phytomonas serpens is a plant parasite that shares antigens with *Trypanosoma cruzi*, the causative protozoan of Chagas disease. These antigens are recognized by human sera from chagasic patients and are able to induce protective immunity in mice by decreasing the hematological changes observed in the acute phase of infection. In the present study, we evaluated the effects of intraperitoneal immunization with *Phytomonas serpens* 15T on the acute phase of *Trypanosoma cruzi*. We observed increased levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-12 in the plasma of the immunized and infected animals. This increase in proinflammatory cytokines led to the increase of NO in the plasma and also in the heart tissue of these animals also resulted in decreased cardiac parasitism. In addition, we evaluated the possible similarity between the main cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*, cruzipain in *Phytomonas serpens* 15T. Using mAb czp-315.d9 (anti-cruzipain antibody), it was observed that the promastigotes of *Phytomonas serpens* 15T not have similarities with the cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*, a major virulence factors of the causative protozoan chagas disease. Our results suggest a possibility of use of plant trypanosomatids as a reliable source of immunogenic agent for the treatment and prevention of Chagas disease.

Keywords: Cisteine Peptidases. Cytokines. Nitric Oxide. *Phytomonas serpens*. *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Formas evolutivas de Trypanosomatidae	15
Figura 2 – Representação esquemática do ciclo biológico de <i>P. serpens</i>	17
Figura 3 – Representação esquemática do ciclo biológico de <i>T. cruzi</i>	20
Figura 4 – Representação esquemática da biossíntese do óxido nítrico a partir da L-arginina, catalisada pela enzima NO sintase.	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cNOS	Óxido Nítrico Sintase Constitutiva
d.p.i	Dias após a infecção
DC	Doença de Chagas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etileno- Diamino-Tetracético
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
G	Aceleração da gravidade
g/L	Gramas por litro
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HEPES	N- [2-hidroxietyl] piperazino N'-[2-acido etanosulfonico]
IFN- γ	Interferon Gama
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
IP ₃	Fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato
IPTG	Isopropil- β -D-tio-galactopiranosideo
kDa	1000 Daltons, unidade de massa molecular para proteína
mRNA	RNA mensageiro
NADPH	Nicotinamida- Adenina- Dinucleotídeo- Fosfato- Hidrogênio
NF- κ B	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
NO	Óxido Nítrico
NO-2	Nitrito
NO-3	Nitrato
NOS	Óxido Nítrico Sintase
O-2	Superóxido
ONOO-	Peroxinitrito
Opb	Oligopeptidase B
PAMPs	Padrões Moleculares Associados aos Patógenos
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI-3k	Fosfatidilinositol 3 kinase
PLC	Fosfolipase

PPRs	Receptores de Reconhecimento de Padrão
PTK	Proteína Tirosina kinase
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RPM	Rotações por minuto
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris- borato EDTA
TCC	Tripomastigotas de Cultivo Celular
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador Beta
TIR	Domínio de Homologia Toll/Receptor Interleucina 1
TLRs	Receptores do Tipo Toll
TM	Tripomastigota Metacíclicos
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TS	Trans-sialidase
VP	Vacúolo Parasitóforo

SUMÁRIO

1	REVISÃO LITERÁRIA.....	14
1.1	FAMILIA TRYPANOSOMATIDAE	14
1.2	GÊNERO <i>Phytomonas</i>.....	16
1.3	DOENÇA DE CHAGAS E <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	18
1.4	PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO	23
1.5	PAPEL DAS PROTEASES	27
1.6	SIMILARIDADES ANTIGÊNICAS ENTRE <i>Phytomonas serpens</i> E <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	29
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivos Gerais	31
2.2	Objetivos Específicos.....	31
	REFERÊNCIAS.....	32
	ANEXOS	49
	ANEXO A – Nitric oxide in heart tissue of <i>Trypanosoma cruzi</i> -infected mice: Association with protective immunity induced by immunization with <i>Phytomonas serpens</i>	50
	ANEXO B – Ausência de uma cisteína protease semelhante à cruzipaína de <i>Trypanosoma cruzi</i> em <i>Phytomonas serpens</i> 15T.....	74
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	88

1 REVISÃO LITERÁRIA

1.1 FAMILIA TRYPANOSOMATIDAE

A ordem Kinetoplastida reúne flagelados com um ou dois flagelos que emergem de uma bolsa flagelar. Há uma única mitocôndria, e o DNA mitocondrial frequentemente aparece condensado em uma região próxima aos corpúsculos basais do flagelo. Essa região, contendo o DNA mitocondrial, é chamada de cinetoplasto (kDNA) e resulta na denominação da ordem. A taxonomia existente é baseada em sua morfologia e ciclo de vida tradicionalmente, o grupo é subdividido em duas subordens: Bodonina, biflagelados com espécies de vida livre e parasitos, e Trypanosomatina, uniflagelados com uma única família Trypanosomatidae (VICKERMAN, 1976).

O DNA cinetoplasto (kDNA), o DNA mitocondrial é único na sua função, estrutura e modo de replicação. É constituído de algumas dezenas de maxicírculos, que codifica as proteínas típicas mitocondriais e RNA ribossomal, e vários milhares de minicírculos, moléculas de RNA guia codificador que funcionam na edição de transcritos de mRNA de maxicírculos. kDNA de minicírculos e maxicírculos na espécie de parasitos da família Trypanosomatidae são topologicamente ligados, formando dois tipos de DNA catenado (SHLOMAI, 2004).

Os tripanossomatídeos possui isolamento de enzimas glicolíticas em uma organela particular, o glicossomo; utilizam a bolsa flagelar para o tráfego de moléculas para dentro e fora da célula; e possuem um método único de gerar microtúbulos corticais (VICKERMAN, 1994).

A família Trypanosomatidae possui nove gêneros que reúnem parasitos obrigatórios; entre os hospedeiros encontram plantas, anelídeos, aracnídeos, insetos, peixes, répteis, anfíbios, aves e mamíferos (CAMARGO, 1999; DOLLET, 1994).

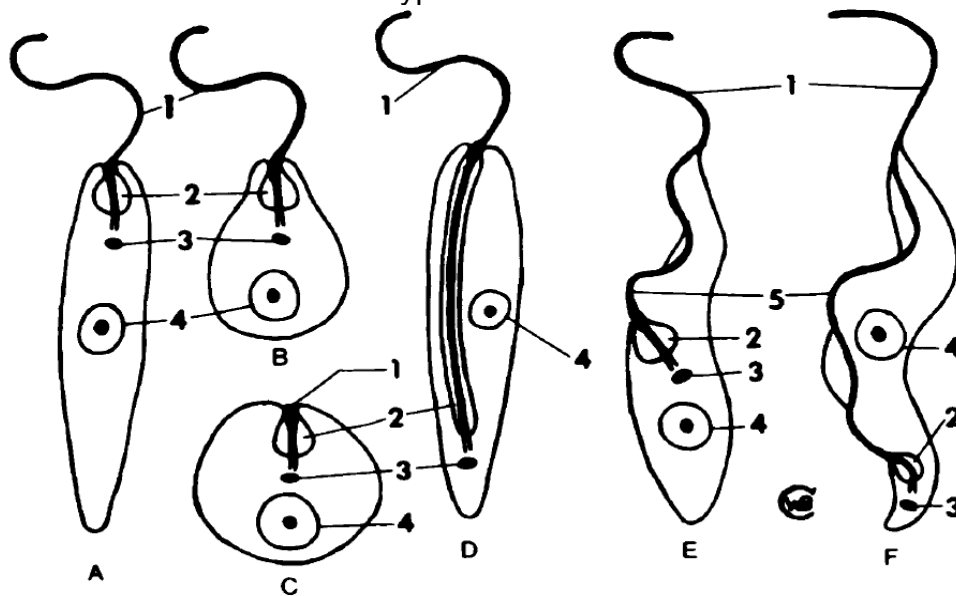
Os gêneros *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas* e *Rhynchoidomonas* são monoxênicos e têm como hospedeiros apenas invertebrados, geralmente insetos da ordem *Diptera* e *Hemiptera*. *Phytomonas* é um parasito de plantas, sendo transmitido pela saliva de hemípteros fitófagos. *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Trypanosoma* são parasitos heteroxênicos de vertebrados, sendo transmitidos por insetos hematófagos, estes apresentam um ciclo de vida complexo,

alternando o parasitismo entre um hospedeiro vertebrado e um invertebrado (MASLOV et al., 2001; MCGHEE; COSGROVE, 1980; VINCKERMAN, 1994).

Os tipos morfológicos são definidos pela posição relativa do núcleo e o cinetoplasto e a forma geral do corpo. Pelo menos dois tipos morfológicos são observados em cada um dos gêneros, dependendo de uma fase do ciclo de vida e condições fisiológicas das células. Alguns morfotipos são excluídos de um determinado gênero, enquanto outros, como promastigotas, são compartilhados por muitos gêneros (MASLOV et al., 2001).

Com base nas formas celulares, à existência e extensão de membrana ondulante, à posição do cinetoplasto relativa ao núcleo, às porções anterior e posterior da célula, e ao formato geral da célula, definem-se as seguintes formas evolutivas: promastigota, opistomastigota, epimastigota, tripomastigota, coanomastigota, amastigota, paramastigota e esferomastigota (Figura 1) (DE SOUZA, 2000; VICKERMAN; PRESTON, 1976).

Figura 1 – Formas Evolutivas de Trypanosomatidae.



A promastigota; B coanomastigota; C amastigota; D epimastigota; E opistomastigota; F tripomastigota; 1- flagelo; 2- bolsa flagelar; 3- cinetoplasto; 4- núcleo; 5- membrana ondulante.

Fonte: MCGHEE e Cosgrove (1980)

Os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* são responsáveis por doenças humanas e animais, tais como leishmaniose, doença do sono e doença de Chagas (VICKERMAN, 1994). E o gênero *Phytomonas* são agentes etiológicos de doenças

que afetam várias plantas e frutos, algumas delas de grande importância econômica (CAMARGO, 1999; DOLLET, 1984).

1.2 GÊNERO *Phytomonas*

Infecção de plantas por tripanossomatídeos são descritas desde 1909, quando Lafont descreveu estes protozoários flagelados em plantas lactíferas (LAFONT, 1909). Baseado no tropismo de tecido dos hospedeiros, tripanossomatídeos de plantas podem ser classificados em quatro grupos principais: (a) lactícola, que incluem flagelados que vivem em látex de diversas famílias de plantas lactíferas; (b) floemícola, composta por flagelados que vivem preferencialmente nos vasos do floema de palmas, embora infectem plantas de café e outras; (c) frutícola, composta por flagelados encontrados na seiva de frutas e sementes de diversas famílias de plantas; (d) florícola, flagelados de flor, são limitados a apenas duas espécies de plantas (CAMARGO, 1999; VICKERMAN, 1994; WALLACE et al., 1992).

Em 1957 foi descrito por Gibbs na África, um tripanossomatídeo parasito exclusivo dos frutos do tomate (*Lycopersicum sculentum*) denominado *Leptomonas serpens*. O nome *Phytomonas* foi introduzido para designar tripanossomatídeos originalmente encontrados no látex de *Euphorbiaceae* e mais tarde em uma ampla variedade de espécies de plantas (CAMARGO, 1999).

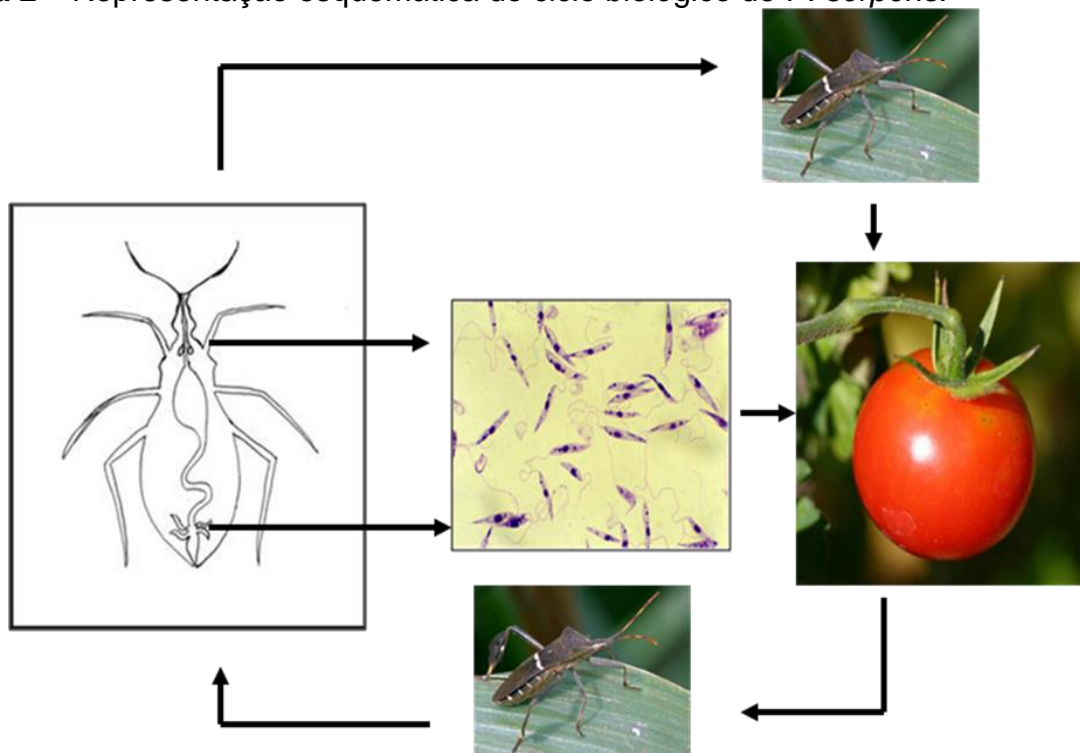
Espécies do gênero *Phytomonas* alternam seu ciclo biológico entre insetos fitófagos da ordem Hemiptera e muitas espécies de plantas (BATISTOTI et al., 2001; JANKEVICIUS et al., 1989). Formas promastigotas do parasito colonizam o sistema digestório desses insetos, atravessam a barreira intestinal e chegam as glândulas salivares através da hemolinfa. Estes microrganismos são transmitidos para o hospedeiro através da saliva do inseto quando se alimentam (Figura 2). Na planta, formas promastigotas são encontradas no floema, tubos lácteos, frutos ou sementes (JANKEVICIUS et al., 1989).

Diferentes grupos têm estudado algumas peculiaridades do metabolismo de *Phytomonas* (CAMARGO, 1999; GONZÁLEZ- HALPHEN et al., 2004; SANCHEZ-MORENO et al., 1992). O sucesso do cultivo de *Phytomonas serpens* (*P. serpens*) isolado de tomate (JANKEVICIUS et al., 1989) permitiu a identificação de algumas características do ciclo de vida e o metabolismo deste organismo. Funções do ciclo

de Krebs e mitocondriais, como a respiração mediada por citocromo C e produção de adenosina tri-fosfato (ATP), são ausentes nestes flagelados e a energia celular é baseada predominantemente pela via glicolítica (BRINGAUD et al., 2006; MASLOV et al., 1999; NAWATHEAN & MASLOV, 2000). Pouco é conhecido sobre o metabolismo de *Phytomonas* no inseto vetor (GONZÁLEZ- HALPHEN et al., 2004; SANCHEZ-MORENO et al., 1992).

No entanto, apenas os tripanossomatídeos encontrados no floema de algumas plantas economicamente importantes causam condições de fitopatologia fatais (CAMARGO, 1999).

Figura 2 – Representação esquemática do ciclo biológico de *P. serpens*.



No inseto, formas promastigotas colonizam o sistema digestório, atravessam a barreira intestinal e atingem as glândulas salivares através da hemolinfa. Essas formas são inoculadas em frutos maduros no momento da picada.

Fonte: Adaptado de JANKEVICIUS et al (1989)

Phytomonas spp. são encontrados em plantas de grande importância econômica, incluindo caju, café, mandioca, coco, dendê e frutos comestíveis, como tomate, laranja, goiaba, uva, carambola entre outros (CAMARGO, 1999; DOLLET, 1984). Os tripanossomatídeos que parasitam exclusivamente frutos não se disseminam para outras partes da planta e multiplicam-se rapidamente em meio de cultura (DOLLET, 1984).

Técnicas bioquímicas e de biologia molecular podem ser aplicadas para a caracterização taxonômica do gênero *Phytomonas* (CONCHON et al., 1989), uma vez que, vários tripanossomatídeos isolados de plantas têm sido descritos como pertencente ao gênero *Phytomonas* (BATISTOTI et al., 2001; CATARINO et al., 2001; FERNANDEZ-RAMOS et al., 1999).

Várias abordagens têm sido propostas para classificar tripanossomatídeos de plantas, tais como reatividade com anticorpos monoclonais (mAbs) (TEIXEIRA; CAMARGO, 1989; TEIXEIRA et al., 1996), atividade enzimática (CAMARGO et al., 1987; FERNÁNDEZ-RAMOS et al., 1999; UTTARO et al., 1997), marcadores moleculares baseados em genes ribossomais (CAMARGO et al., 1992; MARCHÉ et al., 1995; TEIXEIRA et al., 1994) e identificação de genes *spliced-leader* (SL) de *Phytomonas* (SERRANO et al., 1999).

1.3 DOENÇA DE CHAGAS E *Trypanosoma cruzi*

Foi na cidade de Lassance, em Minas Gerais, que o pesquisador brasileiro Carlos Justiniano das Chagas descreveu pela primeira vez uma nova doença em humanos (CHAGAS, 1909). Fato único na história da medicina, onde a mesma pessoa descobriu e descreveu o quadro clínico de uma doença, seu respectivo agente infeccioso, ciclo de vida deste agente, seus vetores e reservatórios, abrangendo assim todos os aspectos básicos de sua epidemiologia e patologia (CHAGAS, 1934).

Passados mais de cem anos de sua descoberta, no Brasil e em diversos países da América Latina, a doença de Chagas é considerada um grave problema de saúde pública. Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que existam cerca de 7 a 8 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi* em 21 países da América Latina (WHO, 2014).

No Brasil, cerca de 1,9 milhões de pessoas vivem com a doença de Chagas, o que representa cerca de um quarto dos casos do mundo. Há uma grande preocupação com o surgimento de novas infecções no Brasil, através do ciclo silvestre ou por acidentes de transmissão oral, especialmente no estado do Amazonas, região onde a população é mais desfavorecida economicamente (HORTEZ; FUJIWARA, 2014).

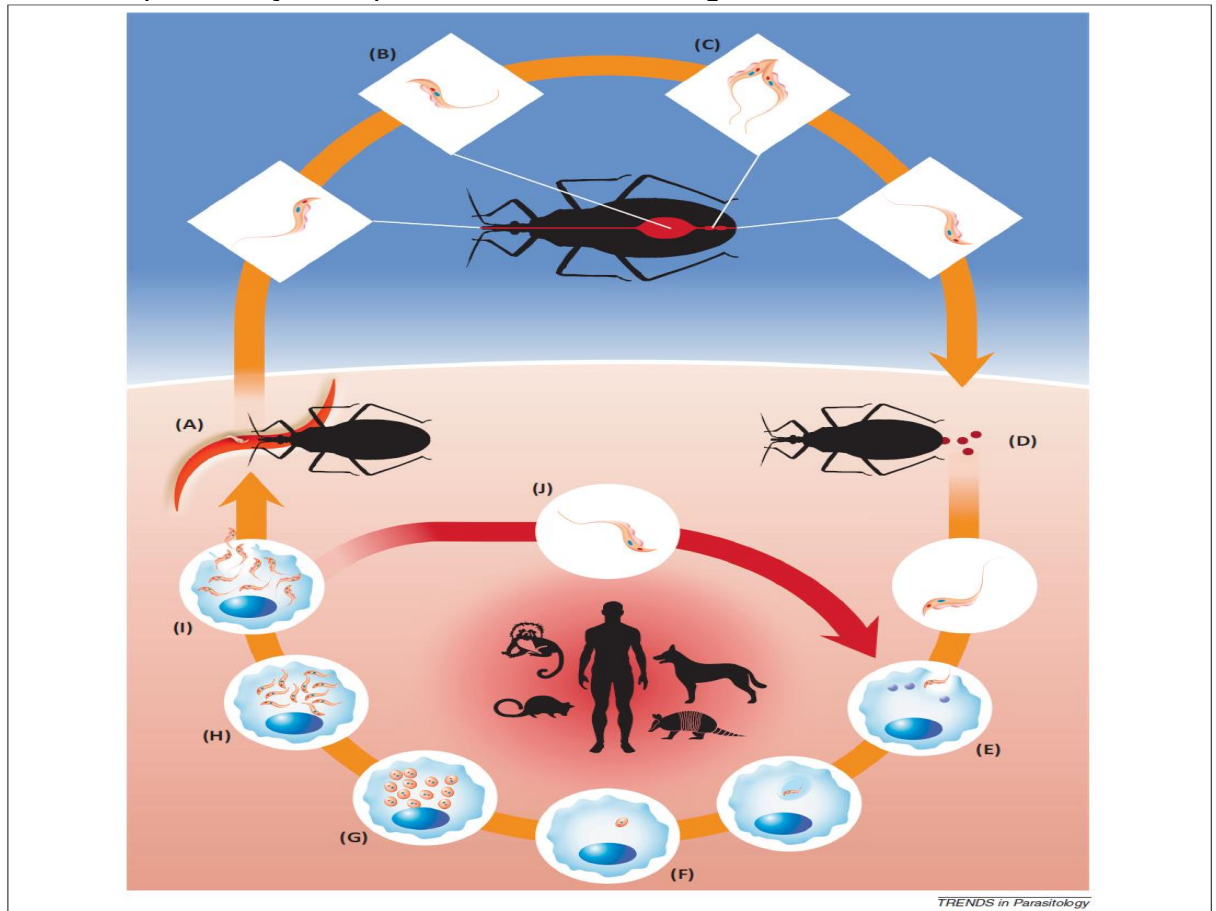
Considerada uma patologia de difícil cura, a doença de Chagas pode comprometer as funções cardíacas de indivíduos acometidos, geralmente na faixa etária de 30 a 50 anos (DE SOUZA et al., 2010).

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e apresenta uma complexa variação morfológica e fisiológica possuindo três principais formas evolutivas: epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas (TEIXEIRA et al., 2006).

A transmissão de *T. cruzi* ocorre principalmente pela deposição de formas tripomastigotas metacíclicos infectantes presentes na urina e fezes de insetos hematófagos da família Reduviidae, dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*. O desenvolvimento de formas não infectantes replicantes, epimastigotas, em formas infectantes tripomastigotas metacíclicos durante seu trânsito no trato gastrointestinal do inseto é essencial para a transmissão aos hospedeiros mamíferos, essas formas podem invadir células nucleadas ou serem fagocitadas por células profissionais como macrófagos ou células dendríticas (VAN OVERTVELT et al., 1999).

Após a invasão do parasito as formas tripomastigotas aderem-se às membranas de diferentes células do hospedeiro. Os parasitos penetram a partir do vacúolo parasitóforo em formação e à medida que o processo de internalização progride, os lisossomos se fundem aos vacúolos. Conforme o pH acidifica, ocorre a ativação de proteínas formadoras de poros que rompem as membranas lisossômicas, os tripomastigotas são então liberados no citoplasma das células infectadas, onde transformam-se em amastigotas, que se multiplicam por divisões binária. Estes por sua vez se diferenciam em tripomastigotas, que provocam a ruptura da membrana celular e são liberados para o interstício (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012). Os tripomastigotas na corrente sanguínea podem infectar outras células (Figura 3).

Figura 3 – Representação esquemática do ciclo biológico de *T. cruzi*.



O ciclo biológico de *T. cruzi* tem início quando o vetor adquire o parasito durante o repasto sanguíneo através da ingestão de sangue contaminado do hospedeiro vertebrado infectado contendo as formas tripomastigotas (A). No estômago do vetor, ocorre a diferenciação destas formas em esferomastigotas e epimastigotas (B), que migram para o intestino médio, aderindo à superfície epitelial e multiplicando-se (C). Ao atingirem o reto, transformam-se em tripomastigotas metacíclicos que são eliminadas juntamente com as fezes e urina do inseto triatomíneo (D). Através de fissuras na pele e mucosas os parasitos caem na corrente sanguínea e invadem as células num processo semelhante à endocitose, formando com a membrana celular o vacúolo parasitóforo (E), evadindo-se da digestão celular para o citoplasma da célula, onde sofre alterações e se diferencia em amastigota citoplasmática (F), novamente se multiplicando (G) e diferenciam-se em tripomastigotas (H), liberadas para a corrente sanguínea através do processo de ruptura celular (I), para completar o ciclo evolutivo do parasito através da infecção de novas células (J) ou podem ser ingeridas por um inseto vetor (A).

Fonte: Perez et al (2014)

Enquanto a transmissão vetorial é o principal modo de infecção, infecções por via oral e transplacentária também podem ocorrer, as demais formas de infecção através de sangue e tecido transplantado de indivíduos cronicamente infectados têm aumentado mundialmente, isso faz com que práticas de triagem de doadores sejam expandidas (BERN et al., 2008; FITZPATRICK et al., 2010).

A infecção caracteriza-se pela existência de uma fase aguda, na qual a parasitemia é comumente observada, seguida por uma fase crônica, em que a carga parasitária é controlada sem que haja completa eliminação dos parasitos. A fase aguda da DC inicia-se após oito a dez dias do contato com *T. cruzi* ou até 20 a 40 dias da transfusão com sangue infectado, podendo ser sintomática ou assintomática (RASSI Jr. et al., 2012). Na fase aguda da infecção uma intensa miocardite acompanhada de um intenso infiltrado inflamatório, frequentemente, é encontrada (GODZEL et al., 2003; ROSSI et al., 1995;).

Considerando, que 5% dos pacientes com sintomas agudos morrem, pode ser estimada que a mortalidade está entre 1:2500 e 1:5000 (TEIXEIRA et al., 2006). Após a fase aguda, geralmente benigna e inaparente segue-se uma fase clínica conhecida como “indeterminada” ou “inaparente”, na qual associam-se ausência de sintomatologia clínica com sorologia positiva.

A forma clínica indeterminada, apesar do seu bom prognóstico em médio prazo (5 a 10 anos), adquiriu uma importância crescente, devido ao significado controverso de anormalidade de alguns testes e as lesões focais do miocárdio em muitos pacientes (PRATA et al., 2001).

Após vinte a trinta anos, cerca de 20% dos indivíduos infectados desenvolvem a fase crônica, sintomática, com diferentes formas clínicas: cardíaca, digestória ou neurológica (ARAUJO-JORGE et al., 2000) que contribuem para as altas taxas de morbidade e mortalidade por DC (DIAS et al., 1999; MAGUIRRE et al., 1987; WANDERLEY et al., 1994). Curiosamente, dois terços dos 18 milhões de pessoas que abrigam a infecção crônica, no mundo por *T. cruzi*, não apresentam qualquer manifestação clínica da doença.

A forma crônica cardíaca é evidenciada pela cardiomiopatia inflamatória de evolução fatal, acompanhada clinicamente por arritmias, fenômenos tromboembólicos, insuficiência cardíaca congestiva e cardiomegalia. Ocorrem lesões no sistema de condução cardíaco, alterações vasculares e lesão apical que contribuem para a destruição progressiva do miocárdio (ANDRADE et al., 2000).

A resposta imunológica gerada contra o parasito também provoca lesões teciduais, associadas ao processo autoimune de destruição do tecido cardíaco ou a produção de mediadores inflamatórios contra o parasito e seus antígenos teciduais (GIRONES, FRESNO, 2003).

Em modelos de infecção experimental, camundongos C3H/HeN infectados durante a fase aguda apresentaram grande infiltrado de fagócitos CD68⁺ e células CD8⁺ (DHIMAN et al., 2011). E também foi mostrado que os níveis de RNAm para TNF- α e IL-1 β foram aumentados em mioblastos humanos (AC16) infectados por *T. cruzi* (BA et al., 2010).

Desde a sua descoberta a doença de Chagas tem sido descrita como uma doença causada pelos danos gerados pela resposta inflamatória e imunológica (COSTA, 1999). O perfil de resistência ou susceptibilidade ao *T. cruzi* no modelo murino depende, além das características do parasito, da imunidade inata e adquirida mediada por macrófagos, célula natural killer (NK), linfócitos T e linfócitos B (GAZZINELLI; DENKERS, 2006; TARLETON, 1995; LIEKE et al., 2006).

As células TCD4⁺ mediam a resposta Th1, que protegem contra a infecção por *T. cruzi*, enquanto a resposta Th2 está correlacionada com a persistência do parasito (TARLETON et al., 1996). O reconhecimento inato dos parasitos envolve o reconhecimento de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) específicos através dos TRLs (receptores semelhantes a Toll) presentes em células apresentadoras. TRLs ligam a imunidade inata e adaptativa aumentando a regulação e capacidade das células acessórias para gerar resposta imune mediada por linfócitos T e B (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010).

O IFN- γ e TNF- α são descritos como as principais citocinas mediadoras de resistência à infecção por *T. cruzi*, por induzirem a ativação de macrófagos e exercerem papel central no controle sobre a carga parasitária através da produção de óxido nítrico (NO) (CARDILLA et al., 1996; VESPA et al., 1994). Estas citocinas induzem o macrófago a produzir NO, que na presença de O⁻² gera o ONOO⁻ que se difunde rapidamente e exerce citotoxicidade contra o parasito controlando a multiplicação intracelular de *T. cruzi* (ALVAREZ et al., 2004).

Enquanto IFN- γ e TNF- α são mediadores de resistência à infecção, as citocinas predominantes no padrão Th2, como TGF- β e IL-10, estão associadas à susceptibilidade (SILVA et al., 1998) por possuírem propriedades inibitórias sobre a proliferação de células T, reduzirem a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e a maturação de células dendríticas, necessárias para a resposta à infecção por *T. cruzi* (TAYLOR; KELLY, 2006). Desta forma, estratégias que reduzam esta modulação podem ser essenciais no desenvolvimento da imunidade protetora contra *T. cruzi* (ALBA et al., 2010).

O tratamento da DC é basicamente constituído por terapêutica farmacológica específica contra o parasito, particularmente em casos agudos, congênitos, acidentes de laboratório e em casos crônicos de infecção recente, além do tratamento sintomático durante o curso da infecção crônica (BLITZMAN, 2007; DIAS, 1999).

Atualmente estão disponíveis apenas dois fármacos para o tratamento da DC, o Nifurtimox (Lampit®, Bayer Healthcare) e o Benzonidazol, cuja patente foi doada ao Ministério da Saúde, Brasil, com índice de cura que varia entre 30% a 70%, dependendo da cepa do parasito e fase da doença (DIAS, 1999). O mecanismo do nifurtimox não é completamente compreendido, mas é provavelmente devido à indução da formação de radicais oxidativos no parasito e/ou pelos baixos níveis de tiol por meio da produção de intermediários nitroso, devido a redução do grupo nitro composto pelos parasitos (KEDDERIS et al., 1988; MAYA et al., 2003; VIODÉ et al., 1999). O benzonidazol atua através de três mecanismos efetores: ação tripanocida (formação de ligações covalentes com macromoléculas de *T. cruzi*, como o DNA e citocromo P450); aumenta a fagocitose e a lise dos parasitos por meio de um mecanismo dependente de IFN- γ ; e finalmente, a inibição de crescimento do parasito, bloqueando a fumarato redutase NADPH (DIAS et al., 2009).

No entanto estes fármacos têm apresentados diversos problemas com resistência do parasito, baixa tolerância por pacientes e custo elevado. Segundo a WHO, estão longe de ser considerado um tratamento ideal (ALVIANO et al., 2012).

Novos fármacos estão sendo testado, um deles é o posaconazol, que tem se mostrado promissor no tratamento de pacientes na fase aguda e crônica. Sendo eficaz na eliminação de formas amastigotas de células cardíacas. Alguns estudos têm utilizado combinações com benzonidazol, nifurtimox, alopurinol, entre outros (DIAS et al., 2009).

Inibidores da cruzipaina, um importante cisteína protease de *T. cruzi*, são fortes candidatos para o tratamento (BARR et al., 2005; DOYLE et al., 2007; SAJID et al., 2011). Esta protease é essencial para a viabilidade de todas as fases do ciclo de vida de *T. cruzi*, é importante, participa de etapas chaves, incluindo invasão, divisão e diferenciação do parasito (CAZZULO et al., 2001).

1.4 PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO

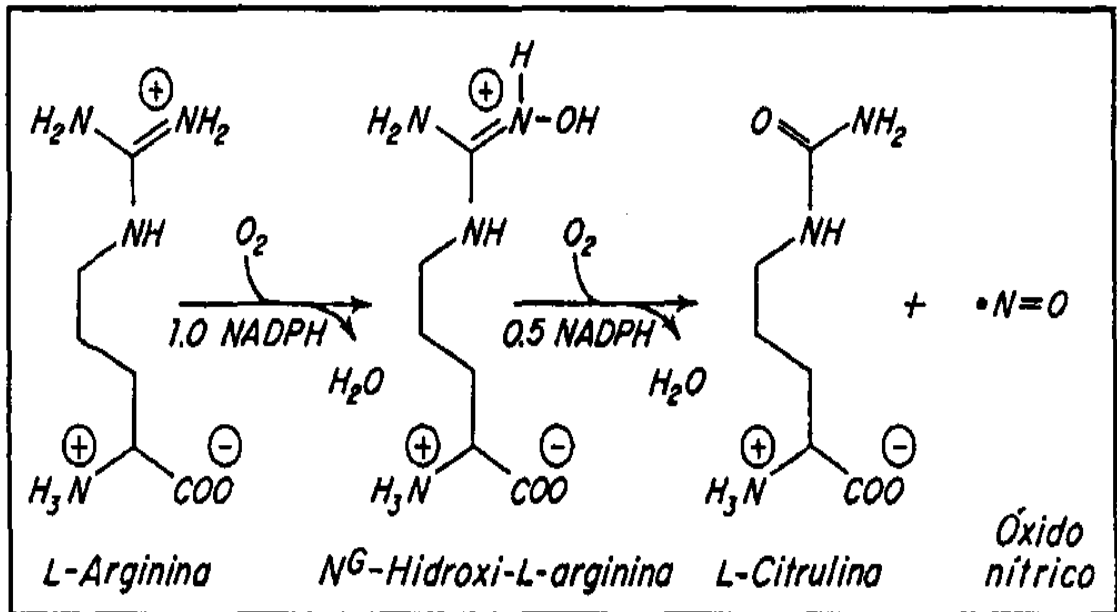
O óxido nítrico (NO) tem sido objeto de diversas pesquisas desde a descoberta de seus efeitos biológicos na década de 80 (FURCHGOTT, ZAWADSKI, 1980). O seu papel foi simplesmente definido como: NO é um produto de macrófagos ativados por citocinas e componentes de microrganismos ou ambos; é derivado do aminoácido L-arginina através da atividade enzimática do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (NATHAN, 1992).

A geração de NO é caracterizada por células do sistema imune (células dendríticas, células NK, mastócitos e células fagocíticas, incluindo monócitos, macrófagos, células de Kupffer, micróglia, eosinófilos e neutrófilos), bem como outras células envolvidas em reações imunológicas (tais como células endoteliais, células epiteliais, células do músculo liso vascular, fibroblastos, condrócitos, queratinócitos, hepatócitos, células mesangiais e células de Schwann) (BOGDAN, 2000).

A produção de NO é catalisada pelas isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), divididas em constitutivas, cálcio-dependentes (cNOS, Nnos ou NOS I, eNOS ou NOS III) e induzível, cálcio independente (iNOS ou NOS II). As NOS oxidam a L-arginina como substrato para produção de L-citrulina e liberação da molécula de NO (Figura 4) (BLOODSWORTH et al., 2000; MULLIGAN; HEVEL; MARLETTA, 1991). Inicialmente, a reação gera o composto intermediário, a N^G-hidroxil-L-arginina, na presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeos-fosfato-hidrogênio (NADPH), Ca⁺² e o O⁻².

Essas enzimas diferem com respeito a sua regulação, amplitude, duração de produção de NO e distribuição celular e tecidual (MACMICKING et al., 1997; STUEHR, 1999).

Figura 4 – Representação esquemática da biossíntese do óxido nítrico a partir da L-arginina, catalisada pela enzima NO sintase.



Fonte: Queiroz; Batista (1999)

A expressão da iNOS é regulada por citocinas e determinada primariamente pela síntese do RNAm para iNOS e sua proteína (CARPENTER et al., 2001, MACMICKING et al., 1997; RODRIGUEZ- PASCUAL et al., 2000). Em contraste com a nNOS e eNOS que existem nas células como proteínas pré-formadas a sua atividade é mudada por elevação da concentração de Ca^{2+} intracelular ligado a calmodulina em resposta a neurotransmissores ou substâncias vasoativas (STUEHR, 1999). Todas as isoformas de NO sintase, neuronal (nNOS ou NOS1), induzível (iNOS e NOS2) e endotelial (eNOS ou NOS3) operam no sistema imunológico (BOGDAN, 2000). Ativação do gene promotor de iNOS é um importante modo de regulação da iNOS por citocinas. Muitos são os fatores de transcrição participantes, entre eles o NF κ B, AP-1, STAT1 α (sinal tradutor e ativador da transcrição), IRF-1 (fator regulador do interferon), NF-IL-6 (fator nuclear da interleucina 6) (GANSTER et al., 2001; MACMICKING et al., 1997).

Dependendo da citocina, do estímulo de microrganismos ou do tipo de células, diferentes vias de sinalização estão envolvidas na promoção (por exemplo, Janus Kinase Jak 1, Jak2 e Tyk2; proteína quinase Raf-1 Erk1/2 e JNK, proteína quinase C, proteínas fosfatases 1 e 2A), ou inibição, (por exemplo fosfoinositol 3 quinase, proteína tirosina fosfatases) da expressão de iNOS (BOGDAN, 2000; CHAKRAVORTTY et al., 2001; CHAN et al., 2001; KRISTOF et al., 2001).

A iNOS catalisa a conversão de arginina em citrulina, liberando gás óxido nítrico (NO) difundível. Este pode combinar com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou superóxido (O_2^-) gerado pela enzima fagócito-oxidase nos fagossomos ácidos, para produzir peroxinitrito ($ONOO^-$) altamente reativo, que pode matar diferentes tipos de microrganismos (DE GROOTE et al., 1999).

Durante a infecção por *T. cruzi*, o NO pode direta ou indiretamente modular o mecanismo efetor de leucócitos através de diversos mecanismos. Este processo envolve efeitos microbicidas derivados de radicais livres tóxicos (peroxinitrito e superóxido) gerados após a produção de NO, bem como regulação da resposta inflamatória induzida durante este tipo de infecção, um duplo papel da imunidade que normalmente é observado para NO. Esta dualidade é bem conhecida e geralmente depende da concentração e uma vez desregulada, pode levar a toxicidade de células hospedeiras, autoimunidade ou persistência do parasito devido à evasão imune, as quais podem levar a patologia (GUTIERREZ et al., 2009).

O NO está envolvido no controle da parasitemia de *T. cruzi* e mata diretamente o parasito *in vitro* (VESPA et al., 1994). NO afeta o *T. cruzi*, modificando quimicamente cisteínas proteinases e/ou por ligação a metaloproteínas que medeiam os processos metabólicos vitais. Foi relatado que o NO ou doadores de NO podem inibir a atividade catalítica de cruzipaina, principal cisteína proteinase de *T. cruzi* (VENTURINI et al., 2000).

Em modelos experimentais para o estudo da DC, a inibição farmacológica da iNOS inibe a capacidade microbicida do macrófago e promove aumento da parasitemia (MARTINS et al., 1998; SILVA et al., 1995). Dentro do fagolisossomo de macrófagos ativados, *T. cruzi* é exposto a espécies reativas de oxigênio formadas pela NADPH oxidase, formando o radical superóxido (O_2^-), e através de dismutação forma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além disso, a indução de óxido nítrico sintase (iNOS) por citocinas pró inflamatórias leva a produção de NO. Tanto O_2^- ou NO por si só não são citotóxicos, mas muitas das suas ações parasiticidas dependem de suas reações para formar o $ONOO^-$, um potente oxidante capaz de ocasionar nitração de proteínas do parasito, agindo como um mecanismo antiparasitário (ALVAREZ et al., 2004; NAVILAT et al., 2005; TRUJILLO et al., 2013).

Há evidências que a participação de linfócitos e dos produtos dos macrófagos na indução de mielossupressão durante a infecção por *T. cruzi*. Essas alterações que ocorrem no sangue e na medula óssea de camundongos infectados por *T. cruzi*

(fase aguda) (CARDOSO, BRENER, 1980; MARCONDES et al., 2000) podem ser consequências da supressão desencadeada por NO e por citocinas ou pelo próprio parasito (PINGE-FILHO et al., 1999).

Atividades supressoras na medula óssea têm sido atribuídas à ação de citocinas, como IFN- α , TNF- α e IFN- γ (BINDER et al., 1997; COOK, 1996; MOLDAWER et al., 1989). Dados obtidos em nosso laboratório mostraram que a anemia que se desenvolve em camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi* é independente de NO (MALVEZI et al., 2004). Além disso, foi mostrado que o uso de inibidores de prostaglandinas ou o bloqueio da produção de TNF- α provocaram aumento dramático de reticulócitos em camundongos C57BL/6, esse aumento ocorre no momento de maior supressão (14^o dia de infecção) e foi revertido pelo bloqueio da produção de NO com aminoguanidina, bloqueador de iNOS (MALVEZI et al., 2004; TATAKIHARA et al., 2008).

Cummings e Tarleton (2004) relataram em seu estudo empregando animais deficientes para iNOS que estes animais apresentaram perfil de sobrevivência semelhante aos animais selvagens e atribuem as diferenças observadas em relação à outros estudos à não especificidade dos bloqueadores de iNOS, que poderiam estar agindo simultaneamente no bloqueio das outras isoformas. Resultados semelhantes foram observados quando camundongos foram desafiados com a cepa Sylvio (MARINHO et al., 2007). Existem relatos sobre a participação estágio-dependentes do NO na DC em modelos experimentais, indicando que esta molécula só é necessária na fase aguda da infecção (SAEFTEL, BERNHARD, HOERAUF, 2001).

1.5 PAPEL DAS PROTEASES

As proteases são enzimas que degradam e catalisam a clivagem de ligações peptídicas em proteínas e peptídeos macromoleculares oligoméricos. Enzimas proteolíticas desempenham diversos papéis fisiológicos e são fatores essenciais no controle homeostático de procariontes e eucariontes (McKERRROW et al., 1993; McKERRROW, 2002; NORTH, 1982; RAO et al., 1998; SAJID; YAO et al., 2003).

As proteases são divididas em dois grandes grupos, dependendo do seu local de ação: exopeptidases e endopeptidases. Exopeptidases clivam ligações peptídicas próximas ao grupo amino ou carboxi terminal do substrato proteico, enquanto as

endopeptidases clivam ligações peptídicas dentro de uma cadeia polipeptídica. Com base na sua ação amino ou carboxi-terminal, as exopeptidases são classificadas como amino ou carboxi-peptidases, respectivamente. Aminopeptídases atuam no NH₂ terminal livre da cadeia polipeptídica e liberam um único resíduo de aminoácido, um dipeptídeo ou tripeptídeo. Carboxi-peptídases agem no terminal COOH da cadeia polipeptídica e liberam um único aminoácido ou um dipeptídeo. Carboxipeptidases podem ainda ser divididas em três grupos principais: serina, metalo e carboxipeptidase de cisteína, com base no grupo funcional presente no sítio ativo das enzimas. Da mesma forma endopeptidases (também conhecidas como proteinases) são classificadas de acordo com resíduos catalíticos essenciais em seus sítios ativos em: serina, metalo, glutamina, treonina, cisteína e aspártico endopeptídases (BARRET, 1994; BARRET et al., 2001; RAO et al., 1998).

Ao longo dos últimos anos tornou-se cada vez mais claro que as proteases produzidas por tripanossomatídeos patogênicos desempenham um papel importante em vários passos da infecção do hospedeiro, tais como: absorção, penetração, sobrevivência intracelular, replicação, diferenciação, evasão imune e nutrição (SANTOS et al., 2006).

Algumas proteases de *T. cruzi* têm sido implicadas em infecções de células hospedeiras, como cruzipaína, oligopeptidase B e gp63. A cruzipaína é uma cisteína proteinase lisossomal isolada e caracterizada em formas epimastigotas (CAZZULO et al., 1990). Esta enzima capaz de degradar a albumina do soro bovino, a hemoglobina, e a azocaseína (BONTEMPI et al., 1989); contém sequências de aminoácidos que apresentam uma homologia considerável com papaína e catepsina L (CAZZULO et al., 1989). É uma cisteína proteinase localizada no sistema endosoma-lisossoma (reservosoma) de epimastigotas, mas também é expressa sobre a superfície de amastigotas de transição (SOUTO- PADRÓN et al., 1990). É secretada pela bolsa flagelar de *T. cruzi* e foi descrita por clivar pequenas moléculas de cininogênio, para gerar cininas que se ligam ao receptor de bradicinina estimulando a liberação de Ca²⁺ mediada por IP3 (MURTA et al., 1990; SCHARFSTEIN et al., 2000).

Oligopeptidase B, uma serina endopeptidase citosólica, é secretada por tripomastigotas de *T. cruzi* (BURLEIGH; ANDREWS, 1995; BURLEIGH et al., 1997). Esta também se liga a superfície das células hospedeiras, ativa fosfolipase C e gera IP3, que promove a liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático (BURLEIGH;

ANDREWS, 1995). Também é encontrada no citoplasma de bactérias Gram negativas e outros protozoários parasitos como *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense*, *Leishmania major* e *Leishmania amazonenses* (COETZER et al., 2008).

A família de metaloproteases gp63 é composta de vários grupos e isoformas da enzima. Dois destes grupos, denominados Tcgp63 I e II, estão presentes em várias cópias de genes no parasito. O grupo Tcgp63 I produz proteínas de superfície, que são diferencialmente expressos durante o ciclo de vida do parasito (CUEVAS et al., 2003).

A atividade de proteases também tem sido verificada em microrganismos fitopatogênicos e correlacionada com a severidade das doenças nas plantas hospedeiras, representando um importante mecanismo para estabelecimento da infecção (MOSLOV; GRIGOR'EVA; VALUEVA; 2010).

Proteases apresentando similaridades com a gp63 (ELIAS et al., 2009; SANTOS et al., 2007) (principal metalopeptidase de *Leishmania spp.*) e cruzipaína (ELIAS et al., 2009; SANTOS et al., 2006; SANTOS et al., 2007) (principal cisteína protease de *T. cruzi*) (CAZZULO, 2002) foram detectadas em *P. serpens*. Esses peptídeos podem contribuir na adesão do parasito às células do hospedeiro invertebrado (D'AVILA- LEVY et al., 2006; SANTOS et al., 2006; SANTOS et al., 2007). Além disso, essas enzimas podem estar envolvidas com a sobrevivência e crescimento do parasito em seus hospedeiros, uma vez que inibidores de proteases interferem na replicação de *P. serpens* (SANTOS et al., 2006).

1.6 SIMILARIDADES ANTIGÊNICAS ENTRE *Phytomonas serpens* E *Trypanosoma cruzi*

É comum observar a expressão de antígenos semelhantes em diferentes espécies de tripanossomatídeos, que revelam alvos chave para o desenvolvimento de vacinas antiparasitárias, bem como métodos de diagnóstico. *Phytomonas serpens* (*P. serpens*), especificamente, compartilha antígenos com alguns tripanossomatídeos digenéticos, como *Leishmania spp.* e *T. cruzi* (BREGANÓ et al., 2003; ELIAS et al., 2008; PINGE-FILHO et al., 2005; SANTOS et al., 2007).

Uma análise proteômica de *P. serpens* 15T utilizando soro de pacientes crônicos com a Doença de Chagas foi realizado por Graça-de-Souza e

colaboradores (2010), com o objetivo de selecionar proteínas que podem participar da reatividade antigênica com *T. cruzi*. Foi realizado uma eletroforese em gel bidimensional (2-DE) de extrato proteico total de *P. serpens* 15T e trinta e um peptídeos do parasito reconhecidos pelo soro foram analisados por espectrometria de massa (MS/MS). Os peptídeos identificados foram agrupados em categorias funcionais e a maioria participa do metabolismo celular (GRAÇA-DE-SOUZA et al., 2010).

Estudos utilizando antígenos de *P. serpens* e soro de pacientes com a doença Chagas mostrou uma forte reatividade. Observou-se também nesse estudo que camundongos BALB/c imunizados com *P. serpens* por via oral ou intraperitoneal desafiados com infecções letais de *T. cruzi* apresentam uma menor parasitemia e maior sobrevivência, quando comparados aos camundongos não imunizados (BREGANÓ et al., 2003).

Foi observado que camundongos C57BL/6 deficientes na enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) desenvolveram maior parasitemia e mortalidade quando desafiados se comparados com os camundongos C57BL/6 selvagens. Além disso, camundongos selvagens imunizados e infectados apresentaram um menor número de ninhos de amastigotas em seus corações, embora a imunização com *P. serpens* não tenha induzido inflamação no miocárdio (PINGE-FILHO et al., 2005).

Recentemente nosso grupo mostrou que a imunização de camundongos C57BL/6 com *P. serpens* impede a trombocitopenia e leucopenia observados na infecção aguda por *T. cruzi*. A imunização também reduz a perda de plaquetas após a injeção intraperitoneal de trans-sialidase recombinante. Além disso, mostramos também que a transferência passiva de soro imune contra *P. serpens* atenua a progressão da trombocitopenia induzida por trans-sialidase recombinante de *T. cruzi* (DA SILVA et al., 2013).

As correlações antigênicas entre *P. serpens* e *T. cruzi* levantam questões importantes sobre novas estratégias de imunização e estudos de moléculas alvo para o desenvolvimento de novos fármacos contra a doença de Chagas. Contudo, o fato dos tripanossomatídeos monoxênicos, incluindo o gênero *Phytomonas*, apresentarem similaridades antigênicas com *T. cruzi* e serem capazes de gerar imunoproteção (BREGANÓ et al., 2003; DA SILVA et al., 2013; PINGE-FILHO et al., 2005) torna necessário o conhecimento das relações existentes entre esses dois gêneros em termos do desenvolvimento da resposta imune.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como meta contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência à infecção por formas tripomastigotas de *T. cruzi*, avaliando os efeitos da imunização intraperitoneal com *P. serpens* 15T sobre a produção de citocinas e óxido nítrico (NO) durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* e análise de similaridade entre cisteínas dos tripanossomatídeos.

2.2 Objetivos Específicos

1- Avaliar o efeito da imunização com formas promastigotas de *P. serpens* 15T sobre a produção dos níveis de óxido nítrico presentes no plasma e no homogenato de tecido cardíaco de camundongos infectados por *T. cruzi*;

2- Avaliar o efeito da imunização sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-12);

3- Avaliar a carga parasitária sanguínea e o parasitismo cardíaco em camundongos imunizados e infectados;

4- Caracterizar proteases de *P. serpens* 15T com similaridade a cruzipaina de *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

- ALBA SOTO CD, SOLANA ME, PONCINI CV, PINO-MARTINEZ AM, TEKIEL V, GONZALEZ-CAPPA SM. Dendritic cells devoid of IL-10 induce protective immunity against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine*; 28:7407-13, 2010.
- ALVAREZ, M.N.; PIACENZA, L.; IRIGOÍN, F.; PELUFFO, G.; RADI, R. Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys*. 15;432(2):222-32, 2004.
- ALVIANO DS, BARRETO AL, DIAS FDE A, RODRIGUES IDE A, ROSA MDO S, ALVIANO CS, SOARES RM. Conventional therapy and promising plant-derived compounds against trypanosomatid parasites. *Front Microbiol*. 6;3:283, 2012.
- ANDRADE, S.G. Patologia experimental da doença de Chagas. In: Brener, Z.; Andrade Z.A.; Barral-Netto, M. (Eds.). *Trypanosoma cruzi* doença de Chagas. Guanabara Koogan R.J., 177-2000, 2000.
- ARAUJO-JORGE, T.C. Modelo animais para o estudo in vivo da Doença de Chagas e de seus aspectos histopatológicos (ocamundongo) In: Doença de Chagas: Manual para experimentação animal, Tânia C. Araujo-Jorge e Solange de Castro (Org). Rio de Janeiro: Fiocruz-Inst. Oswaldo Cruz, 2000.
- BA, X.; GUPTA, S.; DAVIDSON, M.; GARG, N. J. *Trypanosoma cruzi* induces the reactive oxygen species- PARP-1-RelA pathway for up-regulation of cytokine expression in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem*. 9; 285 (15), 2010.
- BARR, S.C.; WARNER, K.L.; KORNREIC, B.G.; PISCITELLI, J.; WOLFE, A.; BENET, L.; MCKERROW, J.H. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 49(12):5160-1, 2005.
- BARRET, A.J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods Enzymol* 244: 1-15, 1994.

BARRET, A.J.; RAWLINGS, N.D.; O'BRIEN, E.A. The MEROPS database as a protease information system. *J Struct Biol* 134:95-102, 2001.

BATISTOTI, M.; CAVAZZANA Jr, M.; SERRANO, M.G.; OGATTA, S.F.; BACCAN, G.C.; JANKEVICIUS, J.V.; TEIXEIRA, M.M.G.; ITOW JANKEVICIUS, S. Generic variability of trypanosomatids isolated from phytophagous hemiptera defined by morphological, biochemical and molecular taxonomic markers. *J. Parasitol.* 87 (6): 1335-1341, 2001.

BERN, C.C.; MONTGOMERY, S.P.S.; KATZ, L.L.; CAGLIOTI, S.; STRAMER, S.L. Chagas disease and the US blood supply. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21: 476-482, 2008.

BINDER, D.; FEHR, J.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R.M. Virus-induced transient bone marrow aplasia: major role of interferon α/β during acute infection with the noncytopathic lymphocytic choriomeningitis virus. *J.Exp.Med.* 185: 517-530, 1997.

BLITZMAN, M. Enfermedad de Chagas-Mazza-ler congress Virtual de cardiologia. Disponível em:<http://www.fac.org.ar>.2007. Acesso em 18 de novembro de 2014.

BLOODSWORTH, A.; O'DONNELL, V.B.; FREEMAN, B.A. Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20(7):1707-15, 2000.

BOGDAN C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2(10):907-16, 2001.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev.* 173:17-26, 2000.

BONTEMPI, E.; MARTINEZ, J.; CAZZULO, J.J. Subcellular localization of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* Feb; 33(1):43-7, 1989.

BREGANÓ, J.W.; PICÃO, R.C.; GRAÇA, V.K.; MENOLLI, R.A.; ITOW JANKEVICIUS, S.; PINGE FILHO, P.; JANKEVICIUS, J.V. *Phytomonas serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. FEMS Immunol Med Microbiol. 5;39(3):257-64, 2003.

BRINGAUD, F., RIVIÈRE, L., COUSTOU, V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. Mol. Biochem. Parasitol. Sep; 149 (1): 1-9, 2006.

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

BURLEIGH, B.A.; CALER, E.V.; WEBSTER, P.; ANDREWS, N.W. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. J Cell Biol. 10; 136(3): 609-20, 1997.

CAMARGO, E.P., SBRAVATE, C., TEIXEIRA, M.M.G., ULIANA, S.R.B., SOARES, M.B.M., AFFONSO, H.T. and FLOETER- WINTER, L.M. Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanosomatids. Journal of Parasitology 78, 40-48, 1992.

CAMARGO, E.P., SILVA, S., ROITMAN, I., DE SOUZA, W., JANKEVICIUS, J.V. and DOLLET, M. Enzymes of ornithine- arginine metabolism in trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. Journal of Protozoology 34, 439-441, 1987.

CAMARGO, E.P. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit, Adv. Parasitol. 42. 29- 112, 1999.

CAMARGO, M.M.; ANDRADE, A.C.; ALMEIDA, I.C.; TRAVASSOS, L.R.; GAZZINELLI, R.T. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. J Immunol. 15;159(12):6131-9, 1997.

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun.* 64(1):128-34, 1996.

CARDOSO, J.E.; BRENER, Z. Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 75(3-4):97-104, 1980.

CARPENTER, L.; CORDERY, D.; BIDEN, T.J. Inhibition of protein kinase C delta protects rat INS-1 cells against interleukin-1beta and streptozotocin-induced apoptosis. *Diabetes.* 51(2):317-24, 2002.

CATARINO, L.M.; SERRANO, M.G.; CAVAZZANA Jr, M.; ALMEIDA, M.L.; KANESHIMA, E.K.; CAMPANER, M.; JANKEVICIUS, J.V.; TEIXEIRA, M.M.G.; ITOW JANKEVICIUS, S. Classification of trypanosomatids of fruits and seeds using morphological, biochemical and molecular markers revealed several genera among fruit isolates. *Fems Microbiol. Letters.* 201: 67- 72, 2001.

CAZZULO, J.J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of chagas disease. *Curr Top Med Chem.* 2(11):1261-71, 2002.

CAZZULO, J.J.; COUSO, R.; RAIMONDI, A.; WEDNSTEDT, C.; HELLMAN, U. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* Feb; 33(1):33-41, 1989.

CAZZULO, J.J.; HELLMAN, U.; COUSO, R.; PARODI, A.J. Amino acid carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. absence of phosphorylated mannose residues. *Mol Biochem Parasitol,* Jan1; 38(1):41-8, 1990.

CHAGAS C. Estado actual da tripanossomíase Americana. *Rev Biol Hyg* 5:58-64, 1934.

- CHAGAS C. New human trypanosomiasis. Morphology and lifecycle of *Schizotrypanum cruzi*, the cause of a new human disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1:159–218, 1909.
- CHAKRAVORTTY, D.; KATO, Y.; SUGIYAMA, T.; KOIDE, N.; UM, M.M.; YOSHIDA, T.; YOKOCHI, T. The inhibitory action of sodium arsenite on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 267.4 macrophage cells: a role of Raf-1 in lipopolysaccharide signaling. J Immunol. 1;166(3):2011-7, 2001.
- CHAN, J.Y.; WANG, S.H.; CHAN, S.H. Differential roles of iNOS and nNOS at rostral ventrolateral medulla during experimental endotoxemia in the rat. Shock. 15(1):65-72, 2001.
- COETZER, T.H.; GOLDRING, J.P.; HUSON, L.E. Oligopeptidase B: a processing peptidase involved in pathogenesis. Feb; 90(2):336-44, 2008.
- CONCHON, I.; CAMPANER, M.; SBRAVATE, C.; CAMARGO, E. P. *Trypanosomatids*, other than *Phytomonas spp*, isolated and cultured from fruit. J. Protozool, 36 (4): 412-414, 1989.
- COOK, H.T.; CATTELL, V. Role of nitric oxide in immune-mediated diseases. Clin Sci (Lond). Oct;91(4):375-84, 1996.
- COSTA, S.C. Mouse as a model for Chagas disease: does mouse represent a good model for Chagas disease? Mem Inst Oswaldo Cruz. 94 Suppl 1:269-72, 1999.
- COURA, J.R.; BORGES- PEREIRA, J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. Ver. Soc. Bras. Med. Trop. Jun; 45(3): 286-96, 2012.
- CUEVAS, I.C.; CAZZULO, J.J.; SÁNCHEZ, D.O. GP63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. Infect Immun 71:5739- 5749, 2003.

CUMMINGS KL, TARLETON RL. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun.* Jul;72(7):408 1-9, 2004.

D'AVILA-LEVY C.M., SANTOS L.O., MARINHO F.A., DIAS F.A., LOPES A.H., SANTOS A.L.S., BRANQUINHA M.H. Gp-63-like molecules in *Phytomonas serpens*: possible role in the insect interaction. *Current Microbiology*, v. 52, p.439-444, 2006.

DA SILVA, R.V.; MALVEZI, A.D.; AUGUSTO, L.D.A. S.; KIAN, D.; TATAKIHARA, V. L.; YAMAUCHI, L.M.; YAMADA-OGATTA, S.F.; RIZZO, L.V.; SCHENKMAN, S.; PINGE-FILHO, P. Oral exposure to *Phytomonas serpens* attenuates thrombocytopenia and leukopenia during acute infection with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One.* Jul 2;8(7), 2013.

DE GROOTE, M.A.; FANG, F.C. Antimicrobial properties of nitric oxide. In nitric oxide and infections (ed. Fang F.C.) 231-261, 1999.

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

DE SOUZA, W.; O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: Brener, Z.; Andrade, Z. A.; Barral- Neto, M.; (Eds) *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2000.

DHIMAN, M.; GARG, N.J. NADPH oxidase inhibition ameliorates *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis during Chagas disease. *J. of Pathol.*225 (4):583-596, 2011.

DIAS, J.; SCHOFIELD, C. The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 Suppl 1:103-21, 1999.

DIAS, J.C. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Jul;104 Suppl 1:41-5, 2009.

DOLLET M. Identification and characterization of pest organisms: a plant trypanosomes case study. In: Identification and Characterization of Pest Organisms (D.L. Hawksworth, ed.), pp.415-426. Wallingford, UK: CAB International, 1994.

DOLLET, M.; Plant diseases caused by flagellate protozoa (*Phytomonas*), Annu. Rev. Phytopathol. 22. 115- 132, 1984.

DOYLE, P.S.; ZHOU, Y.M.; ENGEL, J.C.; MCKERROW, J.H. A cysteine protease inhibitor cures Chagas' disease in an immunodeficient-mouse model of infection. Antimicrob Agents Chemother. Nov;51(11):3932-9,2007.

ELIAS C.G., AOR A.C., VALLE R.S., d'AVILA-LEVY C.M., BRANQUINHA M.H., SANTOS A.L. Cysteine peptidases from *Phytomonas serpens*: biochemical and immunological approaches. FEMS Immunology and Medical Microbiology, v. 57, p. 247-256, 2009.

ELIAS, C.G.; PEREIRA, F.M.; DIAS, F.A.; SILVA, T.L.; LOPES, A.H.; D'AVILA-LEVY, C.M.; BRANQUINHA, M.H.; SANTOS, A.L. Cysteine peptidases in the tomato trypanosomatid *Phytomonas serpens*: influence of growth conditions, similarities with cruzipain and secretion to the extracellular environment. Exp Parasitol. Dec;120(4):343-52, 2008.

FERNANDEZ-RAMOS, C.; LUQUE, F.; FERNANDEZ-BECERRA,C.; OSUNA, A.; ITOW JANKEVICIUS, S.; JANKEVICIUS, J.V.; ROSALES, M.J.; SANCHEZ-MORENO, M. Biochemical characterization of flagellates from fruits and seeds from Brazil. Fems Microbiol. Letters, 170: 343- 348, 1999.

FITZPATRICK, M.A.; CAICEDO, J.C.; STOSOR, V.; ISON, M.G. Expanded infectious diseases screening program for Hispanic transplant candidates. Transpl. Infect. Dis. 12: 336-341, 2010.

FURCHGOTT, R.; ZAWADZKI, J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature, 288:373-6,1980.

GANSTER, R.W.; TAYLOR, B.S.; SHAO, L.; GELLER, D.A. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 17;98(15):8638-43,2001.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E.Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for the host parasitism. *Nat. Rev. Immunol.* 6 (12): 895-906, 2006.

GIBBS, A.J. *Leptomonas serpens* n sp parasitic in the digestive tract and salivary gland of *Nezara viridula* (Pentatomidae) and in the sap of *Solanum lycopersicum* (Tomato) and other plants. *Parasitol.* 47: 297- 303, 1957.

GIRONES, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence or both? *Trend. Parasitol.* 19(1):19-22, 2003.

GODZEL, L.M.; LEON, J.R.; ENGMAN, D.M. Angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonistic in experimental myocarditis. *Curr. Pharmal. Des.* 9:723-735, 2003.

GONZÁLEZ-HALPHEN, D.; MASLOV, D.A.; NADH- ubiquinone oxidoreductase activity in the kinetoplasts of the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*, *Parasitol. Res.* 92 341- 346, 2004.

GRAÇA-DE SOUZA VK, MONTEIRO-GÓES V, MANQUE P, SOUZA TA, CORRÊA PR, BUCK GA, ÁVILA AR, YAMAUCHI LM, PINGE-FILHO P, GOLDENBERG S, KRIEGER MA, YAMADA-OGATTA SF. Sera of chagasic patients react with antigens from the tomato parasite *Phytomonas serpens*. *Biol Res.* 43(2):233-41, 2010.

GUTIERREZ, .FR.; MINEO, T.W.; PAVANELLI, W.R.; GUEDES, P.M.; SILVA, J.S. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Jul;104 Suppl 1:236-45, 2009.

HIDEKO TATAKIHARA, V.L.; CECCHINI, R.; BORGES, C.L.; MALVEZI, A.D.; GRAÇA-DE SOUZA, V.K.; YAMADA-OGATTA, S.F.; RIZZO, L.V.; PINGE-FILHO, P. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. FEMS Immunol Med Microbiol. Jan;52(1):47-58,2008.

HOTEZ, P.J.; FUJIWARA, R.T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. Microbes Infect. 16(8):601-6, 2014.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. Science. Jan 15;327(5963):291-5, 2010.

JANKEVICIUS, J.V.; JANKEVICIUS, S.I.; CAMPANER, M.; CONCHON, I.; MAEDA, L.A.; TEIXEIRA, M.M.G.; FREYMULLER, E.; CAMARGO, E.P.; Life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes, J. Protozool. 36.265- 271, 1989.

KEDDERIS, G.L.; MIWA, G.T. The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents. Drug Metab Rev. 19(1):33-62,1988.

KRISTOF, A.S.; MARKS-KONCZALIK, J.; MOSS, J. Mitogen-activated protein kinases mediate activator protein-1-dependent human inducible nitric-oxide synthase promoter activation. J Biol Chem. Mar 16;276(11):8445-52, 2001.

LAFONT, A. Sur la presence d'un *Leptomonas*, parasite de la classe des Flagellés dans le látex de trois *Euphorbiacées pilulifera*. Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie 66, 1011-1013, 1910.

LIEKE, T.; STEEG, C.; GRAEFE, S.E.; FLEISCHER, B.; JACOBS, T. Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*- infected fibroblasts. Clin Exp Immunol. Aug;145(2):357-64, 2006.

MACMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol. 15:323-50, 1997.

MAGUIRRE, J.H.; HOFF, R. Cardiac morbidity and mortality due to Chagas disease: prospective eletrocardiographic study of a Braziliancommunity. *Circulation*. 75(6):1140-1145, 1987.

MALVEZI, A.D.; CECCHINI, R.; DE SOUZA, F.; TADOKORO, C.E.; RIZZO, L.V.; PINGE-FILHO, P. Involvement of nitric oxide (NO) and TNF-alpha in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. May 1;41(1):69-77, 2004.

MARCHÉ, S., ROTH, C., PHILIPPE, H., DOLLET, M. and BALTZ, T. Characterization and detection of plant trypanosomatids by sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Molecular and Biochemical Parasitology* 71, 15-26, 1993.

MARCONDES, M.C.; BORELLI, P.; YOSHIDA, N.; RUSSO, M. Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes Infect*. Apr;2(4):347-52, 2000.

MARINHO, C.R.; NUNEZ-APAZA, L.N.; MARTINS-SANTOS, R.; BASTOS, K.R.; BOMBEIRO, A.L.; BUCCI, D.Z.; SARDINHA, L.R.; LIMA, M.R.; ALVAREZ, J.M. IFN- γ , but not nitric oxide or specific IgG, is essential for the in vivo control of low-virulence Sylvio 10/4 *Trypanosoma cruzi* parasites. *Scand. J. Immunol*, 66:297-308, 2007.

MARTINS, G.A.; CARDOSO, M.A.; ALIBERTI, J.C.; SILVA, J.S. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunol. Lett* 63(2):113-120, 1998.

MASLOV, D.A., YASUHIRA. S., SIMPSON, L. Phylogenetic affinities of *Diplonema* within the Euglenozoa as inferred from the SSU rRNA gene and partial COI protein sequences. *Protist* 150, 33-42, 1999.

- MASLOV, D.A.; PODLIPAEV, S.A. LUKES, J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. Mem Inst Oswaldo Cruz; 96 (3): 397-402, 2001.
- MAYA, J.D.; BOLLO, S.; NUÑEZ-VERGARA, L.J.; SQUELLA, J.A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PÉRIÉ, J.; CHAUVIÈRE, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurán derivatives. Biochem Pharmacol. Mar 15;65(6):999-1006, 2003.
- MCGHEE, R.B.; COSGROVE, W.B.; Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae, Microbial. Rev. 44. 140- 173, 1980.
- McKERROW, J.H.; SUN, E.; ROSENTHAL, P.J.; BOUVIER, J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. Annu Ver Microbiol 47:821-853, 1993.
- MOLDAWER, L.L.; MARANO, M.A.; WEI, H.; FONG, Y.; SILEN, M.L.; KUO, G.; MANOGUE, K.R.; VLASSARA, H.; COHEN, H.; CERAMI, A.; et al. Cachectin/tumor necrosis factor-alpha alters red blood cell kinetics and induces anemia in vivo. FASEB J. Mar;3(5):1637-43, 1989.
- MULLIGAN, M.S.; HEVEL, J.M.; MARLETTA, M.A.; WARD, P.A. Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. Proc Natl Acad Sci U S A. Jul 15;88(14):6338-42, 1991.
- MURTA, A.C.; PERSECHINI, P.M.; PADRON, T.S.; DE SOUZA, W.; GUIMARÃES, J.A.; SCHARFSTEIN, J. 1990. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. Mol Biochem Parasitol. Nov; 43 (1):27-38, 1990.
- NATHAN C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J. Sep;6(12):3051-64, 1992.

- NAVILAT, M.; GUALCO, G.; CAYOTA, A.; RADÍ, R. Protein 3-nitrotyrosine formation during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Bras. J. Med. Biol. Res.* 38(12):1825-34, 2005.
- NAWATHEAN, P., MASLOV, D.A. The absence of genes for cytochrome c oxidase and reductase subunits in maxicircle kinetoplast DNA of the respiration-deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Curr. Genet.* 38(2):95-103, 2000.
- NORTH, M.J. Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms. *Microbiol Ver* 46:308-340, 1982.
- PEREZ, C. J.; LYMBERG, A.J.; THOMPSON, R.C.A. Chagas disease: The challenge of polyparasitism. *Trends in Parasitology*, p176-182, 2014.
- PINGE-FILHO, P.; PERON, J.P.; DE MOURA, T.R.; MENOLLI, R.A.; GRAÇA, V.K.; ESTEVÃO, D.; TADOKORO, C.E.; JANKEVICIUS, J.V.; RIZZO, L.V. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* provided by oral immunization with *Phytomonas serpens*: role of nitric oxide. *Immunol Lett.* Jan 31;96(2):283-90, 2005.
- PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C.E.; ABRAHAMSOHN, I.A. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol.* Apr 10;193(1):90-8, 1999.
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet. Infect. Dis.* 1(2):92-100, 2001.
- QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A.A. Funções biológicas do Óxido Nítrico. *Química Nova*, 22 (4), 1999.
- RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Ver* 62:597- 635, 1998.

RASSI A JR, RASSI A, MARIN-NETO JA. Chagas disease. *Lancet*. 375(9723):1388-402, 2010.

RODRIGUEZ-PASCUAL, F.; HAUSDING, M.; IHRIG-BIEDERT, I.; FURNEAUX, H.; LEVY, A.P.; FÖRSTERMANN, U.; KLEINERT, H. Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric-oxide synthase gene. Involvement of the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem*. Aug 25;275(34):26040-9, 2000.

ROSSI, M.A.; BESTETTI, R.B. The challenge of Chaga' cardiomyopathy: the pathologic roles of autonomic abnormalities autoimmune mechanism and microvascular changes, and therapeutic implications. *Cardiology*. 86:1-7, 1995.

SAEFTEL M, FLEISCHER B, HOERAUF A. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*. Apr;69(4):2252-9, 2001.

SAJID, M.; MCKERROW, J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol* 120:1-21, 2002.

SAJID, M.; ROBERTSON, S.A.; BRINEN, L.S.; MCKERROW, J.H. Cruzain : the path from target validation to the clinic. *Adv Exp Med Biol*. 712:100-15, 2011.

SANCHEZ-MORENO M, LASZTITY D, COPPENS I, OPPERDOES FR. Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas spp.* isolated from *Euphorbia characias*. *Mol Biochem Parasitol*. 54(2):185-99, 1992.

SANTOS, A.L.; D'AVILA- LEVY, C.M.; ELIAS, C.G.; VERMELHO, A.B.; BRANQUINHA, M.H. *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. *Microbes Infect*. Jul; 9(8):915-21, 2007.

SANTOS, A.L.S.; D'AVILA-LEVY, C.M.; DIAS, F.A.; RIBEIRO, R.O.; PEREIRA, F.M.; ELIAS, C.G.; SOUTO- PADRÓN, T.; LOPES, A.H.; ALVIANO, C.S.; BRANQUINHA,

M.H.;SOARES,R.M.*Phytomonas serpens*: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion. Int J Parasitol; Jan; 36 (1):47-56, 2006.

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M.M.; LIMA, A.P.; MORROT, A.; JULIANO, L.; MÜLLER-ESTERL, W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. J Exp Med. Nov 6; 192(9):1289-300, 2000.

SERRANO, M.G.; NUNES, L. R.; CAMPANER, M.; BUCK, G.A.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M.G. Trypanosomatidae *Phytomonas* detection in plants and Phytophagous Insects by PCR Amplification of Genus- specific Sequence of the Spliced Leader gene. Exp. Parasitol. 91: 268- 279, 1999.

SHLOMAI, J. The structure and replication of kinetoplast DNA. Curr Mol Med; 4 (6): 623-47, 2004.

SILVA, J.S.; ALIBERTI, J.C.; MARTINS, G.A.; SOUZA, M.A.; SOUTO, J.T.; PÁDUA, M.A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Braz J Med Biol Res. Jan;31(1):111-5, 1998.

SILVA, J.S.; VESPA, G.N.; CARDOSO, M.A.; ALIBERTI, J.C.; CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. Infect Immun. Dec;63(12):4862-7, 1995.

SOUTO- PADRÓN, T.; CAMPETELLA, O.E.; CAZZULO, J.J.; DE SOUZA, W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. J Cell Sci. Jul; 96(Pt3):485-90, 1990.

STUEHR, D.J. Mammalian nitric oxide synthases. Biochim Biophys Acta. May 5;1411(2-3):217-30, 1999.

TARLETON, R. L. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. Parasitol Today. Jan;11(1):7-9, 1995.

TARLETON, R.L.; GRUSBY, M.J.; POSTAN, M.; GLIMCHER, L.H. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol.* Jan;8(1):13-22, 1996.

TAYLOR, M.C.; KELLY, J.M. pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Biotechnol.* Jul 6;6:32, 2006.

TEIXEIRA, A.R.L.; NITZ, N.; GUIMARO, M.C.; GOMES, C. Chagas disease. *Postgrad.Med. J.* 82(974):788-797, 2006.

TEIXEIRA, M.M.G. AND CAMARGO, E.P. Monoclonal antibodies for the identification of trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. *Journal of Protozoology* 36, 262- 264, 1989.

TEIXEIRA, M.M.G., CAMPANER, M. and CAMARGO, E.P. Detection of trypanosomatid *Phytomonas* parasitic in plants by polymerase chain reaction amplification of 18S ribosomal DNA. *Parasitology Research* 80, 512-516, 1994.

TEIXEIRA, M.M.G., SERRANO, M.G., NUNES, L.R., CAMPANER, M., BUCK, G. and CAMARGO, E.P. Trypanosomatidae: a spliced- leader derived probe specific for the genus *Phytomonas*. *Experimental Parasitology* 84, 311-319, 1996.

TRUJILLO, N.; ALVAREZ, M.N.; PIANCENZA, L.; HUGO, M.; PELUFFO, G.; RADI, R. Peroxinitrito as a citotoxic effector against *Trypanosoma cruzi*: Oxidative killing and antioxidant resistance mechanism. *Trypan. Diseases: Molecular Routes to Drug Discovery* 2013.

UTTARO, A.D. and OPPERDOES, F.R. Purification and characterization of a novel iso-propanol dehydrogenase from *Phytomonas sp.* *Molecular and Biochemical Parasitology* 85, 213-219, 1997.

VAN OVERTVELT, L.; VANDERHEYDE, N.; VERHASSELT, V.; ISMAILI, J.; DE VOS, L.; GOLDMAN, M.; WILEMS, F.; VRAY, B. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infect Immun* 67:4033-4040, 1999.

VENTURINI G, SALVATI L, MUOLO M, COLASANTI M, GRADONI L, ASCENZI P. Nitric oxide inhibits cruzipain, the major papain-like cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun*. Apr 13;270(2):437-41, 2000.

VESPA, G.N.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun*. Nov;62(11):5177-82, 1994.

VICKERMAN, K.; The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates, *Int. J. Parasitol.* 24. 1317- 1331,1994.

VICKERMEN & PRESTON. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. Em: Lumsden WHR, Evans DA (eds). *Biology of kinetoplastida*, vol I. London: Academic Press, pp 66-102, 1976.

VIODÉ, C.; BETTACHE, N.; CENAS, N.; KRAUTH-SIEGEL, R.L.; CHAUVIÈRE, G.; BAKALARA, N.; PÉRIÉ, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. *Biochem Pharmacol*. Mar 1;57(5):549-57, 1999.

WALLACE F.G., ROITMAN I., CAMARGO E.P. Trypanosomatids of plants. In: *Parasitic Protozoa* (J.Kreier and J.R. Baker, eds), 2nd edn, Vol.2, pp. 55-84. San Diego: Academic Press, 1992.

WANDERLEY, D.M.V.; LITVOC, J. Doença de Chagas como causa básica de óbito na região sudeste do Brasil: presença de causas contributórias. *Ver. Saúde Pub.* 28:69-75, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas diseases (American trypanosomiasis). In: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acessado em 08/10/2014.

ANEXOS

ANEXO A

Dear Dr. Rosiane da Silva,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Acta Tropica

Corresponding Author: Phileo Pinge-Filho

Co-Authors: Rosiane V da Silva, MS; Aparecida D Malvezi, Ph.D; Lucy M Yamauch, Ph.D; Jussevania Pereira-Santos, MS; Nágela G Zanluqui, Graduate; Maria I Lovo-Martins, MS; Marli C Martins-Pinge, Ph.D; Vera L Tatakihara, Ph.D; Sergio Schenkman, Ph.D; Luiz V Rizzo, Ph.D; Sueli F Yamada-Ogatta, Ph.D;

Title: Nitric oxide in heart tissue of *Trypanosoma cruzi*-infected mice: association with protective immunity induced by immunization with *Phytomonas serpens*

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at pingefilho@uel.br; pingemp@sercomtel.com.br; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/actrop/l.asp?i=51563&l=G9YFTBS9>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Acta Tropica

Elsevier Editorial System(tm) for Acta Tropica

Manuscript Draft

Manuscript Number: ACTROP-D-15-00119

Title: Nitric oxide in heart tissue of *Trypanosoma cruzi*-infected mice: association with protective immunity induced by immunization with *Phytomonas serpens*

Article Type: Research Paper

Keywords: Chagas disease; *Phytomonas serpens*; Nitric oxide; Heart; Parasite burden; Cytokines

Corresponding Author: Prof. Phileno Pinge-Filho, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Universidade Estadual de Londrina

First Author: Rosiane V da Silva, MS

Order of Authors: Rosiane V da Silva, MS; Aparecida D Malvezi, Ph.D; Lucy M Yamauch, Ph.D; Jussevania Pereira-Santos, MS; Nágela G Zanluqui, Graduate; Maria I Lovo-Martins, MS; Marli C Martins-Pinge, Ph.D; Vera L Tatakihara, Ph.D; Sergio Schenkman, Ph.D; Luiz V Rizzo, Ph.D; Sueli F Yamada-Ogatta, Ph.D; Phileno Pinge-Filho, Ph.D

Abstract: The genus *Phytomonas* includes parasites that are etiological agents of important plant diseases, especially in Central and South America. These parasites are transmitted to plants by an infected phytophagous hemipteran bite. The existence of shared antigens between pathogenic and non-pathogenic trypanosomatids opened up the possibility that species non-infectious to humans, which are economically feasible and easy to culture at large scale, could be potentially useful as antigen sources for immunization to Chagas disease. Our objective was analyze the effect of immunization of mice with *P. serpens*, isolated from tomato fruit on nitric oxide (NO) production in the heart and plasma associate with parasite burden in the early of *Trypanosoma cruzi* infection. In this report, we found that infected C57BL/6 mice present higher heart parasitism than immunized infected mice ($P < 0.05$). This resistance correlated with increased NO production in the heart and in the plasma when compared with unimmunized mice ($P < 0.05$). It was observed that the levels of IL-1, TNF- α , IL-6, and IL-12 were higher in the plasma of immunized and *T. cruzi*-infected mice compared to non-

immunized and infected mice ($P < 0.05$). These findings open a new avenue for comparative investigations into trypanosomatid biology and provides an alternative safer of immunogenic agents for therapeutic in Chagas heart disease.

Nitric oxide in heart tissue of *Trypanosoma cruzi*-infected mice: association with protective immunity induced by immunization with *Phytomonas serpens*

Rosiane V. da Silva^a, Aparecida D. Malvezi^a, Lucy M. Yamauchi^b, Jussevania Pereira-Santos^b, Nagela G. Zanluqui^c, Maria Isabel Lovo-Martins^c, Marli Cardoso Martins-Pinged, Vera L.H. Tatakihara^a, Sergio Schenkman^e, Luiz V. Rizzor, Sueli F. Yamada-Ogatta^b, Phileno Pinge-Filho^{a,*}

^a *Laboratório de Imunopatologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 86051-97, Paraná, Brasil*

^b *Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 86051-97, Paraná, Brasil*

^c *Instituto Carlos Chagas - Fiocruz, Curitiba, 81350-010, Paraná, Brasil*

^d *Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia cardiovascular, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 86051-97, Paraná, Brasil*

^e *Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, R. Botucatu, 862 8A, 04023-062, São Paulo, Brasil*

^f *Hospital Israelita Albert Einstein, Av. Albert Einstein 627-701, 2-SS Bloco A, 05651- 901 São Paulo, Brasil; Instituto de Investigação em Imunologia, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), Brasil*

Abbreviations used: GYPMI, Glucose, Yeast extract, Peptone, Meat infusion; PBS, Phosphate-buffered saline; NO, Nitric oxide.

***Corresponding author at:** Phileno Pinge-Filho Ph.D., Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail address: pingefilho@uel.br (Pinge-Filho, P.), Tel: + 55 43 3371-4978; Fax: + 55 43 3371-4465.

Abstract

The genus *Phytomonas* includes parasites that are etiological agents of important plant diseases, especially in Central and South America. These parasites are transmitted to plants by an infected phytophagous hemipteran bite. The existence of shared antigens between pathogenic and non-pathogenic trypanosomatids opened up the possibility that species non-infectious to humans, which are economically feasible and easy to culture at large scale, could be potentially useful as antigen sources for immunization to Chagas disease. Our objective was analyze the effect of immunization of mice with *P. serpens*, isolated from tomato fruit on nitric oxide (NO) production in the heart and plasm associate with parasite burden in the early of *Trypanosoma cruzi* infection. In this report, we found that infected C57BL/6 mice present higher heart parasitism than immunized-infected mice ($P < 0.05$). This resistance correlated with increased NO production in the heart and in the plasma when compared with unimmunized mice ($P < 0.05$). It was observed that the levels of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and IL-12 were higher in the plasma of immunized and *T. cruzi*-infected mice compared to non-immunized and infected mice ($P < 0.05$). These findings open a new avenue for comparative investigations into trypanosomatid biology and provides a safer alternative of immunogenic agents for therapeutic in Chagas heart disease.

Keywords: Chagas disease; Cytokines; Heart; Nitric oxide; *Phytomonas serpens*; Parasite burden

1. Introduction

The parasites of the Trypanosomatidae family include several genera comprising monoxenous insect trypanosomatids of *Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Blastocrithidia*, *Angomonas*, and *Strigomonas*, and heteroxenous parasites such as *Phytomonas*, the etiological agent of plant diseases (Camargo, 1999; Ferreira et al., 2014; Jirku et al., 2012; Teixeira et al., 2011).

Included among the heteroxenous trypanosomatids are species responsible for a broad spectrum of human and animal diseases, such as *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp., which are responsible for respectively Chagas disease, visceral and tegumentary leishmaniasis (Ferreira et al., 2014). The combined number of people infected by kinetoplastid pathogens is estimated to be over 20 million, resulting in various health problems and more than 100,000 deaths each year (Stuart et al., 2008).

Studies aimed at clarifying the affinities between the members of the Trypanosomatidae family have been performed by several researchers (de Souza T de et al., 2011; Etges, 1992; Graca-de Souza et al., 2010; Pereira et al., 2010; Santos et al., 2007; Yao, 2010). Recently, it was showed that crude extract of *Crithidia* and *Leptomonas* have epitopes similar to *L. (L.) chagasi* (Ferreira et al., 2014).

In addition, antigens from *Phytomonas serpens* and *Leptomonas* sp. were tested for vaccine purposes and induced relevant immune protection against *T. cruzi* infection in mice (Bregano et al., 2003; de Souza T de et al., 2011; Pinge-Filho et al., 2005; Souza M do et al., 1974), which supports the idea of using them as antigens source for the serodiagnosis of diseases provoked by kinetoplastid.

Chagas disease is caused by the trypanosomatid hemoflagellate *T. cruzi* and affects approximately eight million individuals in Latin America, of whom 30-40% either have or will develop cardiomyopathy, digestive megasyndromes, or both (Rassi et al., 2012). During acute infection, TNF- α alone or in association with other cytokines control parasite replication via the release of nitric oxide (NO) by macrophages (Aliberti et al., 1999) and cardiomyocytes (Machado et al., 2000).

There is no information about how protective immunity induced by *P. serpens* could be modulating the NO production in the cardiac tissue during acute Chagas disease. In this report, we showed that the previous immunization with *P. serpens* provoked less severe cardiac parasitism and was associated with NO overproduction.

These findings supports the idea of the development of whole-organism-based vaccines targeting phytoflagellates trypanosomatids species as a safer source of immunogenic agents for therapeutic options in Chagas heart disease.

2. Material and Methods

2.1 Ethics Statement

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation (<http://www.cobea.org.br/>). The Committee on the Ethics of Animal Experiments at Londrina State University approved the protocols (CEEA-UEL, 01/2009 and 35/2011).

2.2 Mice

Six to 12- week- old C57BL/6 female and male mice were supplied by the Multi Institucional Center for Biological Investigation (CEMIB), State University of Campinas, Brazil. Mice were maintained under standard conditions in the animal house of the Department of Pathological Sciences, Londrina State University, Londrina, Brazil. Commercial rodent diet (Nuvilab- CR1, Nuvital, Campo Mourão, Brazil) and sterilized water were available *ad libitum*.

2.3 Parasites

T. cruzi (Y strain) (Silva and Nussenzweig, 1953) as maintained by weekly intraperitoneal (i.p.) inoculation of Swiss mice with 2×10^5 trypomastigotes. To conduct our experiments, blood from previously inoculated Swiss mice was obtained by cardiac puncture with heparinized syringes. *P. serpens* 15T, isolated from tomato fruit (*Lycopersicon esculentum*) (Jankevicius et al., 1988) was cultured in GYPMI medium (glucose, yeast extract, peptone, and meat infusion) (Bregano et al., 2003) at 28°C.

2.4 Immunization of Mice and Challenge with *T. cruzi*

For immunization of C57BL/6, living forms of *P. serpens* 15T collected during log phase growth were washed 3 times by centrifugation at 3000 g for 5 min in 15 mM PBS (phosphate- buffered saline, pH 7.2) and administered by (i.p) inoculation. Each inoculum consisted of 1×10^7 living parasites/ 0.1 mL 15 mM PBS, pH 7.2 given 4 times at 1-week intervals (Bregano et al., 2003; da Silva et al., 2013). Seven days after the last immunization

with *P. serpens*, C57BL/6 mice were infected i.p. with a non-lethal (5×10^3 cells/animal) dose of trypomastigotes. Control mice received PBS alone, (Fig.1).

2.5 Nitric Oxide (NO) quantification

Nitric oxide (NO) concentration in plasma and heart tissue obtained from uninfected and *T. cruzi*-infected mice on day 12 dpi was estimated by measuring nitrite, as described previously (Navarro-Gonzalvez et al., 1998; Panis et al., 2011). All reagents for the nitrite assay were obtained from Sigma Chemical Co.

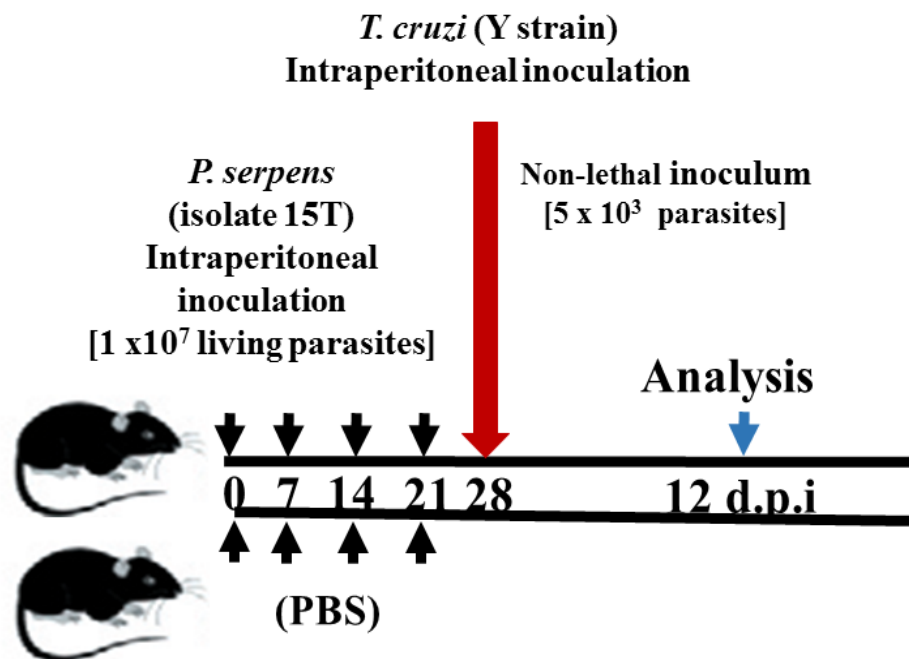


Fig.1. Experimental design. C57BL/6 mice were immunized with 1×10^7 living forms of *P. serpens* 15T given 4 times at 1-week intervals. Seven days after the last immunization, mice were infected by via intraperitoneal (i.p.) with a non-lethal (5×10^3 cells/animal) dose of blood trypomastigotes of the *T. cruzi* (Y strain) and analysis at 12 days post-infection (dpi), according experimental protocol. Control mice received PBS alone.

2.6 Multiplex bead-based cytokines

Using a bead-based multiplexing kit (Invitrogen Mouse Cytokine Magnetic 10- Plex Panel). For magnetic bead assays our instrument (Luminex MAGPIX® with exponent

software) was calibrated with the MAGPIX® Calibration Kit (MPX-CAL- K25) and performance verified with the MAGPIX® Performance Verification Kit (MPX- PVER- K25), according to the manufacturer's standards.

2.7 RT-qPCR

Real time qPCR was performed to determine the tissue parasite burden in controls (only infected-mice) and *T. cruzi*-infected/immunized animals. Heart tissues were collected from mice at 12 dpi, weight and washed in PBS. The genomic DNAs were purified using the lyses buffer [50mM Tris-HCl pH7.6, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.2mg/mL of proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA)] followed by phenol/chloroform extraction. Samples were mechanically homogenized (Ultra stirrer, Scientific SDN BHD, Malasia) heated for 12h at 55°C, and extract twice with phenol:chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1). Cold ethanol (Merck), twice the volume of the extracted sample, was then added to the aqueous phase and samples were stored at -20°C for 12h. Then, samples were centrifuged for 30 min at 10,000 g, washed with 70% ethanol, dried at room temperature and resuspended in 10 mM Tris HCl pH 8.5 (Valdez et al., 2012).

Real-time PCR was performed using the Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG with ROX reagent (Invitrogen Corporation, New York, USA) with 100 ng of total gDNA. The primer sequences used were TCZ-F 5'-GCTCTTGCCCACAMGGGT GC-3' and TCZ-R 5'CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3' (Cummings and Tarleton, 2003). Samples were amplified in a thermal cycle Corbett Rotor-Gene™ with the following PCR conditions: first step (2 min at 50°C), second step (10 min at 95°C) and 40 cycles (30 s at 95°C, 30 s at 57°C, 30 s at 72°C, 15 s at 82°C), followed by a dissociation stage. The results were based on a standard curve constructed with DNA from culture samples of *T. cruzi* epimastigotes (Y strain).

2.8 Data analysis

The results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Significance was evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni or Tukey's multiple comparison tests; all differences mentioned were significant compared to controls ($P < 0.05$). All statistical analyses were conducted with GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3. Results

3.1 *T. cruzi*-infected C57BL/6 mice present higher heart parasitism than immunized-infected mice

Following i.p. infection with Y strain blood forms (day 12 after infection), C57BL/6 mice developed higher heart parasitism than immunized and infected mice (Fig.2).

As NO is important effector molecule in the destruction of *T. cruzi*, we sought to compare its production in both groups of mice. NO production in heart obtained after 12 days of infection was twofold higher in C57BL/6 infected mice than uninfected mice. Immunization with *P. serpens* increased NO production in the heart compared with unimmunized mice (Fig. 3, $P < 0.05$).

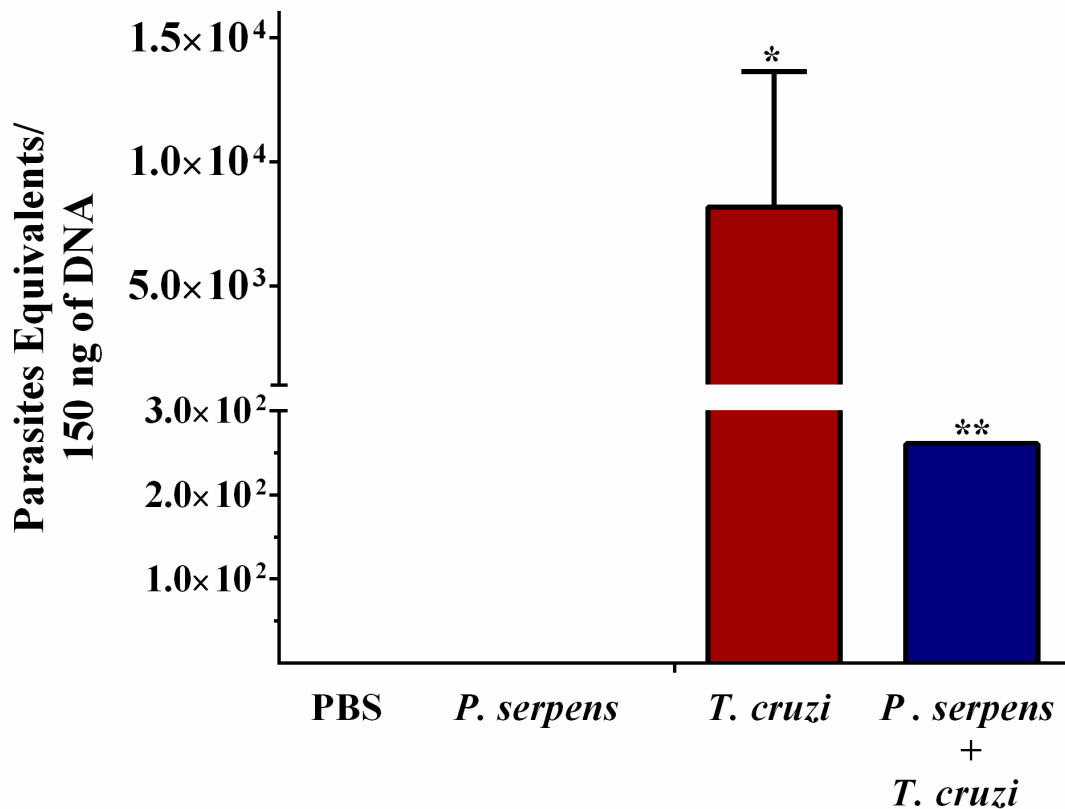


Fig. 2. Parasite DNA content in cardiac tissue. Real-time PCR analysis of hearts from C57BL/6 mice immunized with 1×10^7 living forms of *P. serpens* 15T, infected with 5×10^3 blood trypomastigotes of the *T. cruzi* (Y strain) or both (immunized and infected). Hearts were extracted 12 days after infection. Controls received PBS.* $P < 0.0001$ compared to non-infected mice. ** $P < 0.01$ compared to infected mice.

3.2 Higher resistance of heart parasitism to *T. cruzi* infection in immunized mice correlates with higher production of NO and inflammatory cytokines in the plasma

The resistance of heart parasitism was associated with increase of NO production in the plasma of immunized and infected mice (day 12 d.p.i) when compared with unimmunized mice (Fig. 4, $P < 0.05$).

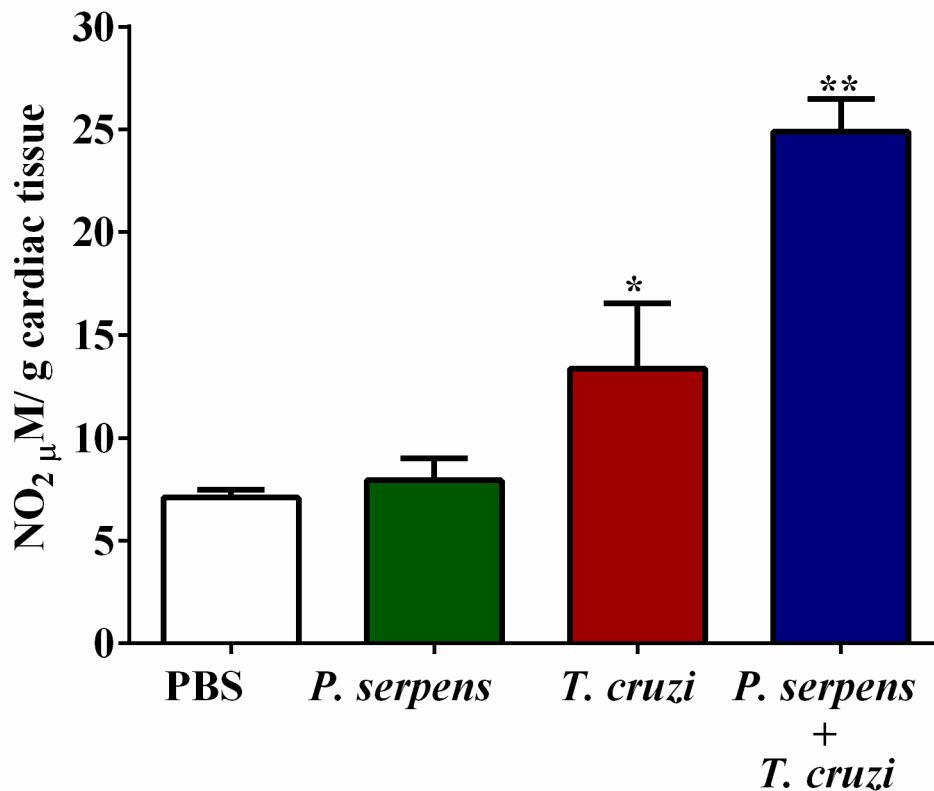


Fig.3. Nitric oxide (NO) levels in the cardiac tissue. Concentrations of nitrate/nitrite were measured in the heart from C57BL/6 mice immunized with 1×10^7 living forms of *P. serpens* 15T, infected with 5×10^3 blood trypomastigotes of the *T. cruzi* (Y strain) or both (immunized and infected). Hearts were extracted 12 days after infection. Controls received PBS. * $P < 0.005$ at 12 days post-infection, using modified Griess methodology. ** $P < 0.05$ compared to infected mice.

In addition, we investigated comparatively the levels of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and IL-12 production in the plasma (Fig.5) of C57BL/6 mice, the immune mediators that are necessary to control the parasite. It was observed that the levels of cytokines analyzed were higher in the plasma of immunized and *T. cruzi*-infected mice compared to non-immunized and infected

mice (Fig.5, $P < 0.05$). Thus, immunization with *P. serpens* appears to modulate NO and inflammatory cytokines in favor of controlling the progression of the disease.

4. Discussion

The affinities between the members of the Trypanosomatidae family have led several researchers to use non-pathogenic trypanosomatids to investigate biochemical, cellular and immunological similarities between these species and the human pathogenic species (Bregano et al., 2003; Ferreira et al., 2014; Graca-de Souza et al., 2010; Pereira et al., 2010; Pinge-Filho et al., 2005; Santos et al., 2007).

Although trypanosomatids considered non-pathogenic to humans, reports have shown that they can infect people, particularly those infected with human immunodeficiency virus (HIV), and the lesions may mimic diffuse cutaneous and visceral leishmaniasis (Chicharro and Alvar, 2003; Singh et al., 2013).

The pathophysiology of Chagas disease is associated with enhanced TNF- α and NO production (Pereira et al., 2014; Perez-Fuentes et al., 2007). High NO levels in the serum are associated with the severity of heart injury and electrical and echocardiographic alterations in rhesus monkeys chronically infected with *T. cruzi* (Carvalho et al., 2012).

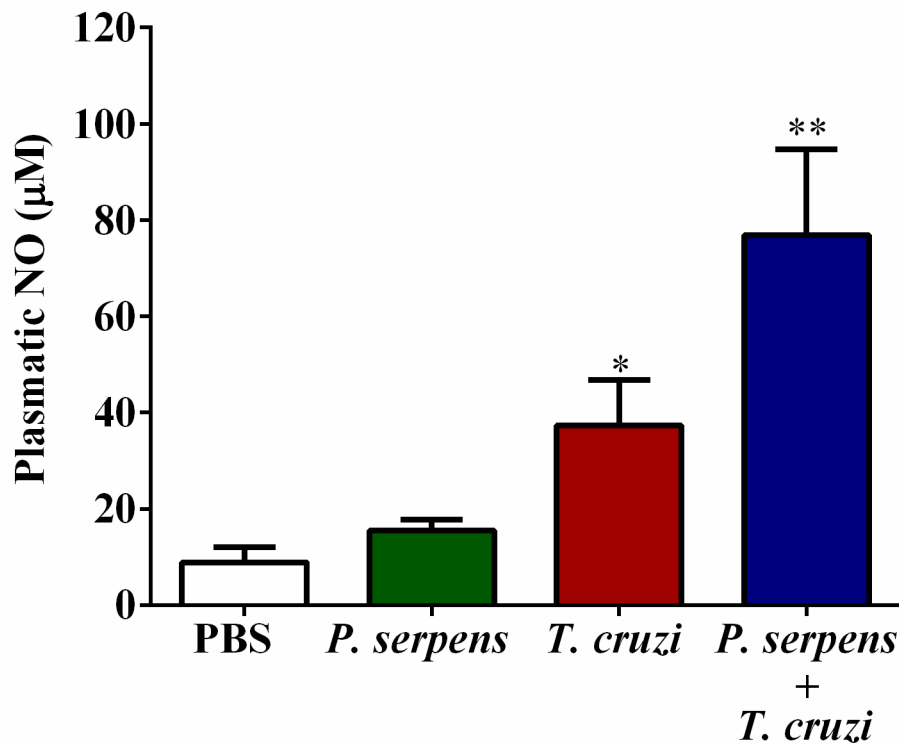


Fig.4 Nitric oxide (NO) levels in the plasma. Concentrations of nitrate/nitrite were measured in the plasma from C57BL/6 mice immunized with 1×10^7 living forms of *P. serpens* 15T, infected with 5×10^3 blood trypomastigotes of the *T. cruzi* (Y strain) or both (immunized and infected). Plasma was obtained 12 days after infection. Controls received PBS.* $P < 0.001$ at 12 days post-infection, using modified Griess methodology.** $P < 0.05$ compared to immunized and infected mice.

In acute infection, NO plays a beneficial role as trypanocidal agent (Malvezi et al., 2004; Silva et al., 2003). Moreover, *T. cruzi* infection, especially occurring in a cytokine-enriched milieu, induces NO expression by macrophages and cardiomyocytes (Aliberti et al., 1999; Machado et al., 2000; Malvezi et al., 2014a; Malvezi et al., 2014b).

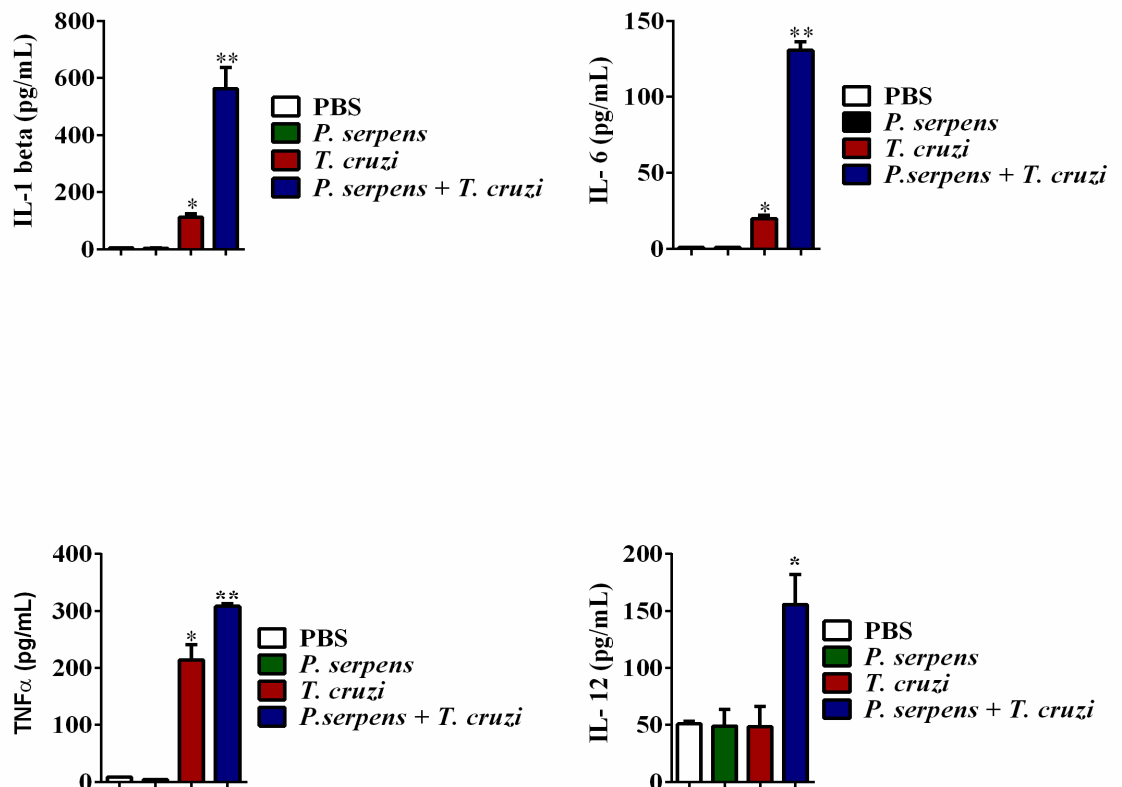


Fig.5. Cytokines levels in the plasma. Concentrations of IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-12 were measured using a bead-based multiplexing kit (Invitrogen Mouse Cytokine Magnetic 10 - Plex Panel). C57BL/6 mice were immunized with 1×10^7 living forms of *P. serpens* 15T, infected with 5×10^3 blood trypomastigotes of the *T. cruzi* (Y strain) or both (immunized and infected). Plasma was obtained 12 days after infection. Controls received PBS.* $P < 0.001$ at 12 days post-infection, using modified Griess methodology.** $P < 0.05$ compared to immunized and infected mice.

Despite all the evidence, suggesting antigenic similarities between *T. cruzi* and plant trypanosomatid *P. serpens* only one previous study investigated the role of NO in the protective immune response against *T. cruzi* induced by *P. serpens* (Pinge-Filho et al., 2005). iNOS knockout (KO) mice and controls treated with aminoguanidine (NO inhibitor), infected with *T. cruzi*, were used to demonstrate that NO is of primary relevance to the resistance of acute *T. cruzi* infection in the mice orally immunized with *P. serpens* (15T).

The results obtained in the present study showed that mice infected with *T. cruzi* exhibited higher plasma levels of NO in comparison with uninfected animals. Although iNOS is not considered essential for the control of *T. cruzi* infection (Cummings and Tarleton, 2004), the elimination of trypomastigote forms in the acute phase is dependent on a number of

factors (Pascutti et al., 2003) and (Cardillo et al., 2007), one of which is the production of NO catalysed by iNOS (Aliberti et al., 1996; Petray et al., 1995; Vespa et al., 1994), Petray et al., 1995, and (Holscher et al., 1998).

In this study, we evaluated whether intraperitoneal inoculation of *P. serpens* in mice induces heart protection facilitated by NO and cytokines production in *T. cruzi*-infected mice. Our results revealed that *T. cruzi*-infected C57BL/6 mice present higher heart parasitism than immunized-infected mice. These data corroborate with those found in previous studies (Pinge-Filho et al., 2005). This protective response is associated with higher production in the plasma of NO and inflammatory cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6 and IL-12), necessary to control the parasite.

The increase of levels of NO observed in plasma of the mice-immunized-infected group could be related to the high expression of iNOS in the heart that have direct contact with blood. In this manner, such compartments could contribute to the systemic increase in NO in the infected group. On the other hand, the differences in profile of plasma NO observed between the infected and immunized-infected group could arise from the *Phytomonas*-host interaction initially established.

The mechanism by which NO production is induced by *P. serpens* in heart remain to be determined. One possibility is that *P. serpens* antigens, especially the cruzipain-like cysteine peptidases (Elias et al., 2009) and calmodulin (CaMP) (de Souza Tde et al., 2011) may induce the enzyme directly. Alternatively, iNOS expression may result from autocrine stimulation by cytokines and chemokines released by cardiomyocytes after exposure to *P. serpens*.

In immunized mice, the production of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-12 increase compared with controls mice. TNF- α increased on day 12 after *T. cruzi* infection, suggests that they might have been the stimulus for NO production.

5. Conclusions

Taken together, these results show that exposure to *P. serpens* confers protective immunity that attenuates cardiac parasitism in *T. cruzi* infected mice. In conclusion, our observations argue for efforts to a better understanding about pathogenesis during *T. cruzi* infection and claim that the use of the plant trypanomatids as a safer source of immunogenic agents for Chagas disease.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq, 471854/08-5) and Fundação Araucária (FA, 296/2012 - chamada nº 05/2011). Rosiane V. da Silva the recipient of a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). SS, LVR, MCMP, and PPF received research fellowship from CNPq.

References

- Aliberti, J.C., Cardoso, M.A., Martins, G.A., Gazzinelli, R.T., Vieira, L.Q., Silva, J.S., 1996. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infection and immunity* 64, 1961-1967.
- Aliberti, J.C., Machado, F.S., Souto, J.T., Campanelli, A.P., Teixeira, M.M., Gazzinelli, R.T., Silva, J.S., 1999. beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity* 67, 4819-4826.
- Bregano, J.W., Picao, R.C., Graca, V.K., Menolli, R.A., Itow Jankevicius, S., Pinge Filho, P., Jankevicius, J.V., 2003. *Phytomonas serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. *FEMS immunology and medical microbiology* 39, 257-264.
- Camargo, E.P., 1999. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Advances in parasitology* 42, 29-112.
- Cardillo, F., Postol, E., Nihei, J., Aroeira, L.S., Nomizo, A., Mengel, J., 2007. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology* 122, 584-595.
- Carvalho, C.M., Silverio, J.C., da Silva, A.A., Pereira, I.R., Coelho, J.M., Britto, C.C., Moreira, O.C., Marchevsky, R.S., Xavier, S.S., Gazzinelli, R.T., da Gloria Bonecini-Almeida, M., Lannes-Vieira, J., 2012. Inducible nitric oxide synthase in heart tissue and nitric oxide in serum of *Trypanosoma cruzi*-infected rhesus monkeys: association with heart injury. *PLoS neglected tropical diseases* 6, e1644.
- Cummings, K.L., Tarleton, R.L., 2003. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Molecular and biochemical parasitology* 129, 53-59.
- da Silva, R.V., Malvezi, A.D., Augusto Lda, S., Kian, D., Tatakihara, V.L., Yamauchi, L.M., Yamada-Ogatta, S.F., Rizzo, L.V., Schenkman, S., Pinge-Filho, P., 2013. Oral exposure to

Phytomonas serpens attenuates thrombocytopenia and leukopenia during acute infection with *Trypanosoma cruzi*. *PloS one* 8, e68299.

de Souza Tde, A., Graca-de Souza, V.K., Lancheros, C.A., Monteiro-Goes, V., Krieger, M.A., Goldenberg, S., Yamauchi, L.M., Yamada-Ogatta, S.F., 2011. Identification, molecular and functional characterization of calmodulin gene of *Phytomonas serpens* 15T that shares high similarity with its pathogenic counterparts *Trypanosoma cruzi*. *The protein journal* 30, 212-219.

Elias, C.G., Aor, A.C., Valle, R.S., d'Avila-Levy, C.M., Branquinha, M.H., Santos, A.L., 2009. Cysteine peptidases from *Phytomonas serpens*: biochemical and immunological approaches. *FEMS immunology and medical microbiology* 57, 247-256.

Etges, R., 1992. Identification of a surface metalloproteinase on 13 species of *Leishmania* isolated from humans, *Crithidia fasciculata*, and *Herpetomonas samuelpessoai*. *Acta tropica* 50, 205-217.

Ferreira, L.R., Kesper, N., Teixeira, M.M., Laurenti, M.D., Barbieri, C.L., Lindoso, J.A., Umezawa, E.S., 2014. New insights about cross-reactive epitopes of six trypanosomatid genera revealed that *Crithidia* and *Leptomonas* have antigenic similarity to *L. (L.) chagasi*. *Acta tropica* 131, 41-46.

Graca-de Souza, V.K., Monteiro-Goes, V., Manque, P., Souza, T.A., Correa, P.R., Buck, G.A., Avila, A.R., Yamauchi, L.M., Pinge-Filho, P., Goldenberg, S., Krieger, M.A., Yamada-Ogatta, S.F., 2010. Sera of chagasic patients react with antigens from the tomato parasite *Phytomonas serpens*. *Biological research* 43, 233-241.

Holscher, C., Kohler, G., Muller, U., Mossmann, H., Schaub, G.A., Brombacher, F., 1998. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infection and immunity* 66, 1208-1215.

Jankevicius, J.V., Itow-Jankevicius, S., Maeda, L.A., Campaner, M., Conchon, I., do Carmo, J.B., Dutra-Menezes, M.C., Menezes, J.R., Camargo, E.P., Roitman, I., et al., 1988. [Biological cycle of *Phytomonas*]. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 83 Suppl 1, 601-610.

Jirku, M., Yurchenko, V.Y., Lukes, J., Maslov, D.A., 2012. New species of insect trypanosomatids from Costa Rica and the proposal for a new subfamily within the Trypanosomatidae. *The Journal of eukaryotic microbiology* 59, 537-547.

Machado, F.S., Martins, G.A., Aliberti, J.C., Mestriner, F.L., Cunha, F.Q., Silva, J.S., 2000. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation* 102, 3003-3008.

Malvezi, A.D., Cecchini, R., de Souza, F., Tadokoro, C.E., Rizzo, L.V., Pinge-Filho, P., 2004. Involvement of nitric oxide (NO) and TNF- α in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS immunology and medical microbiology* 41, 69-77.

Pascutti, M.F., Bottasso, O.A., Hourquescos, M.C., Wietzerbin, J., Revelli, S., 2003. Age-related increase in resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats is associated with an appropriate antibody response. *Scandinavian journal of immunology* 58, 173-179.

Pereira, F.M., Dias, F.A., Elias, C.G., d'Avila-Levy, C.M., Silva, C.S., Santos-Mallet, J.R., Branquinha, M.H., Santos, A.L., 2010. Leishmanolysin-like molecules in *Herpetomonas samuelpessoai* mediate hydrolysis of protein substrates and interaction with insect. *Protist* 161, 589-602.

Pereira, I.R., Vilar-Pereira, G., Silva, A.A., Lannes-Vieira, J., 2014. Severity of chronic experimental Chagas' heart disease parallels tumour necrosis factor and nitric oxide levels in the serum: models of mild and severe disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 109, 289-298.

Perez-Fuentes, R., Lopez-Colombo, A., Ordonez-Toquero, G., Gomez-Albino, I., Ramos, J., Torres-Rasgado, E., Salgado-Rosas, H., Romero-Diaz, M., Pulido-Perez, P., Sanchez-Guillen, M.C., 2007. Correlation of the serum concentrations of tumour necrosis factor and nitric oxide

with disease severity in chronic Chagas disease (American trypanosomiasis). *Annals of tropical medicine and parasitology* 101, 123-132.

Petray, P., Castanos-Velez, E., Grinstein, S., Orn, A., Rottenberg, M.E., 1995. Role of nitric oxide in resistance and histopathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Immunology letters* 47, 121-126.

Pinge-Filho, P., Peron, J.P., de Moura, T.R., Menolli, R.A., Graca, V.K., Estevao, D., Tadokoro, C.E., Jankevicius, J.V., Rizzo, L.V., 2005. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* provided by oral immunization with *Phytomonas serpens*: role of nitric oxide. *Immunology letters* 96, 283-290.

Rassi, A., Jr., Rassi, A., Marcondes de Rezende, J., 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious disease clinics of North America* 26, 275-291.

Santos, A.L., d'Avila-Levy, C.M., Elias, C.G., Vermelho, A.B., Branquinha, M.H., 2007. *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 9, 915-921.

Silva, J.S., Machado, F.S., Martins, G.A., 2003. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 8, s314-325.

Silva, L.H.P., Nussenzweig, V., 1953. Sobre a cepa de *Trypanosomacruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clinical Biology* 20, 191-208.

Souza Mdo, C., Reis, A.P., Da Silva, W.D., Brener, Z., 1974. Mechanism of acquired immunity induced by "*Leptomonas pessoai*" against *Trypanosoma cruzi* in mice. *The Journal of protozoology* 21, 579-584.

Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gurtler, R.E., McKerrow, J., Reed, S., Tarleton, R., 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of clinical investigation* 118, 1301-1310.

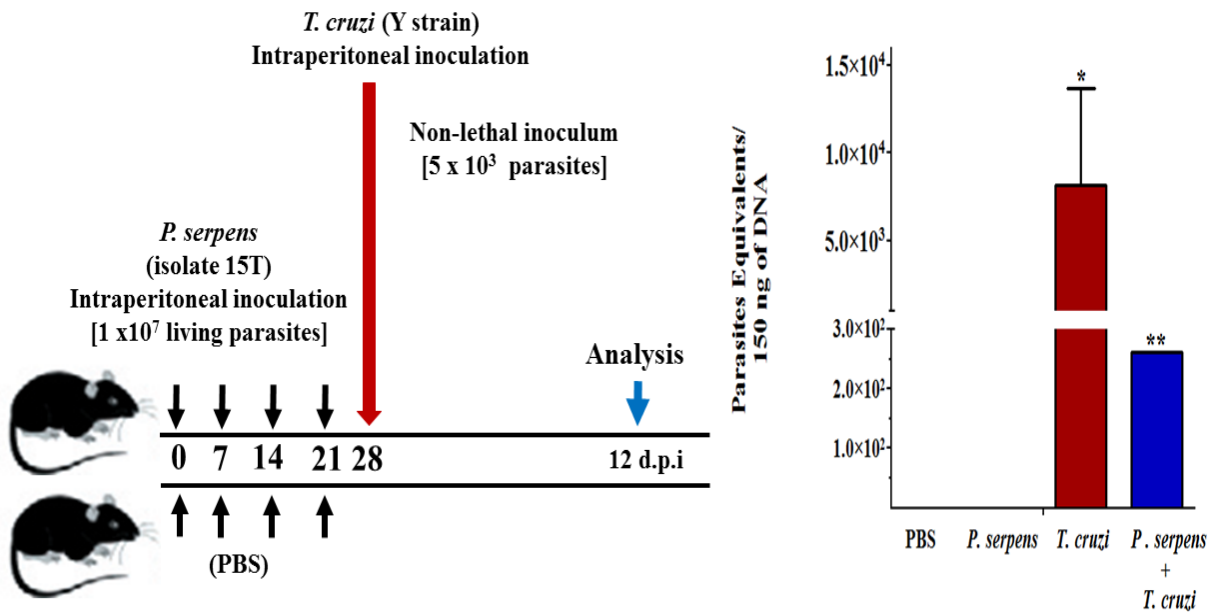
Teixeira, M.M., Borghesan, T.C., Ferreira, R.C., Santos, M.A., Takata, C.S., Campaner, M., Nunes, V.L., Milder, R.V., de Souza, W., Camargo, E.P., 2011. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. *Protist* 162, 503-524.

Valdez, R.H., Tonin, L.T., Ueda-Nakamura, T., Silva, S.O., Dias Filho, B.P., Kaneshima, E.N., Yamada-Ogatta, S.F., Yamauchi, L.M., Sarragiotto, M.H., Nakamura, C.V., 2012. In vitro and in vivo trypanocidal synergistic activity of N-butyl-1-(4-dimethylamino-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide associated with benznidazole. *Antimicrob Agents Chemother*; 56, 507-12.

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

Yao, C., 2010. Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all? *Infection and immunity* 78, 22-31.

Graphical Abstract (for review)



Highlights (for review)**Highlights**

Immunization with *P. serpens* increased NO production in the heart compared with unimmunized mice

Higher resistance of heart parasitism to *T. cruzi* infection in immunized mice correlates with higher production of NO and inflammatory cytokines

Phytoflagellates trypanosomatids species as *P. serpens* can be a safer source of immunogenic agents for therapeutic options in Chagas heart disease.

ANEXO B

Título: Ausência de uma cisteína protease semelhante à cruzipaina de *Trypanosoma cruzi* em *Phytomonas serpens* 15T.

Rosiane V. da Silva^a, Danielle Kian^b, Priscila M. Hiraiwa^c, Aparecida D. Malvezi^a, Maria Isabel Lovo-Martins^c, Nagela G. Zanluqui^c, Vera Lucia H. Tatakihara^a, Stenio P. Fragoso^c, Cassiano Martin Batista^c, Maurilio José Soares^c, Lucy M. Yamauchi^b, Sueli F. Yamada-Ogatta^b, Phileo Pinge-Filho^{a,*}

^a *Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.*

^b *Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil*

^c *Instituto Carlos Chagas, Fiocruz Curitiba, Paraná, Brasil.*

Palavras Chaves: *Cisteína Protease; Phytomonas serpens; Trypanosoma cruzi.*

***Autor Correspondente:** Phileo Pinge-Filho Ph.D., Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail address: pingefilho@uel.br (Pinge-Filho, P.), Tel: + 55 43 3371-4978; Fax: + 55 43 3371-4465.

Resumo

Phytomonas serpens 15T é um tripanossomatídeo não patogênico para humanos que expressam importantes proteínas homologas a tripanossomatídeos patogênicos, como *Trypanosoma cruzi*. Diversos estudos têm mostrado que *Phytomonas serpens* 15T, um tripanossomatídeo isolado de tomate, compartilha antígenos com *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi* expressa peptidases que são conhecidas como fatores de virulência, entre elas, a mais bem descrita é a cruzipaína. Neste estudo mostramos que *Phytomonas serpens* 15T não possui cisteína protease com similaridade a cruzipaína de *Trypanosoma cruzi*. O anticorpo monoclonal murino mAb CZP-315.D9 que reconhece regiões como os reservossomos, não identificou a molécula no tripanossomatídeo de planta em nenhum dos ensaios realizados. Correlações antigênicas entre *Phytomonas serpens* e *Trypanosoma cruzi* levantam questões importantes sobre o estudo de moléculas alvo contra a doença de Chagas, tornando os tripanossomatídeos de plantas como um modelo seguro para o tratamento e prevenção contra a doença de Chagas.

Palavras chaves: Cisteína Protease; *Phytomonas serpens*; *Trypanosoma cruzi*.

Abstract

Phytomonas serpens 15T is a non-pathogenic to humans trypanosomatid expressing important proteins homologous to pathogenic trypanosomes, for example *Trypanosoma cruzi*. Several studies have shown that *Phytomonas serpens* 15 T an isolated tomato trypanosomatid share antigens with *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Trypanosoma cruzi* expressed peptidases which are known as virulence factors, among them, is best described cruzipain. In this study we show that *Phytomonas serpens* 15T does not have cysteine protease with similarity cruzipain of *Trypanosoma cruzi*. The low wall monoclonal antibody mAb-CZP 315.D9 recognizing regions such as the reservosomes, identified the molecule in plant tripanosomatid in any of the tests. Correlations between antigenic *Phytomonas serpens* and *Trypanosoma cruzi* raise important questions about the study of target molecules against Chagas disease, making trypanosomatids plants as a safe model for the treatment and prevention of Chagas disease.

Keywords: Cisteíne Protease; *Phytomonas serpens*; *Trypanosoma cruzi*.

1. Introdução

A família Trypanosomatidae é composta por espécies de parasitos obrigatórios de uma grande variedade de animais, plantas e insetos (VICKERMAN, 1994). Os membros desta família são agentes causadores de importantes doenças humanas, transmitidas por vetores, como a doença de Chagas (tripanossomíase americana), Doença do Sono (tripanossomíase africana) e leishmaniose (VICKERMAN, 1994).

A doença de Chagas é causada pelo protozoário Kinetoplastida, *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*), transmitido pelas fezes do inseto triatomíneo durante o repasto sanguíneo (MONCAYO et al., 2006; SHIKANAI-YASUDA et al., 2012; TOSO et al., 2011). A doença afeta cerca de 8 milhões de pessoas em 18 países da América Latina, cerca de 30-40% dos pacientes infectados têm ou irão desenvolver manifestações neurológicas (PY, 2011), cardiomiopatia, e/ou megasíndromes digestivas (RASSI JR. et al., 2010). A variabilidade na evolução da doença tem sido atribuída as respostas do hospedeiro e a heterogeneidade do parasito (JUNQUEIRA et al., 2010).

Cisteínas proteases tem sido descritas como essenciais para o ciclo de vida de diversos parasitos, catalizando processos relacionados aos fatores de virulência, catabolismo e processamento de proteínas (OSÓRIO et al., 2012).

Cruzipaína é uma cisteína proteínase de *T. cruzi*, está envolvida na invasão da célula hospedeira, desenvolvimento intracelular e evasão da resposta imune (MEIRELLES et al., 1992). A enzima é expressa nas quatro etapas principais do parasito, e está presente em organelas relacionadas com os lisossomos (ALVAREZ et al., 2012) próximo a bolsa flagelar.

T. cruzi exibe reatividade imunológica cruzada com outros Kinetoplastida, incluindo *Leishmania spp.* (GONÇALVES et al., 2002) e tripanossomatídeos de insetos que pertencem ao gênero *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas* e *Blastocrithidia* (LOPES et al., 1981).

Trabalhos interiores de nosso grupo de pesquisa demonstraram que *Phytomonas serpens*, um parasito isolado de tomate também da ordem Kinetoplastida, compartilha antígenos com *T. cruzi* (BREGANÓ et al., 2003). Estes antígenos são reconhecidos por soro humano e induz imunidade protetora dependente de óxido nítrico contra a infecção experimental por *T. cruzi* em camundongos Balb/c (BREGANÓ et al., 2003; GRAÇA-DE-SOUZA et al., 2010; PINGE-FILHO et al., 2005).

A imunização de camundongos C57BL/6 com *P. serpens* impede a trombocitopenia e leucopenia observados na infecção aguda por *T. cruzi*. A imunização também reduzindo a perda de plaquetas após a injeção intraperitoneal de trans-sialidase recombinante. Além disso,

mostramos que a transferência passiva de soro imune contra *P. serpens* atenua a progressão da trombocitopenia induzida por trans-sialidase recombinante de *T. cruzi* (DA SILVA et al., 2013).

As correlações antigênicas entre *P. serpens* e *T. cruzi* levantam questões importantes sobre novas estratégias de imunização e estudos de moléculas alvo contra a doença de Chagas. Contudo, o fato dos tripanossomatídeos monoxênicos, incluindo o gênero *Phytomonas*, apresentarem similaridades antigênicas com *T. cruzi* e serem capazes de gerar imunoproteção (BREGANÓ et al., 2003; DA SILVA et al., 2013; PINGE-FILHO et al., 2005) torna necessário o conhecimento das relações existentes entre esses dois gêneros.

Relatamos neste estudo que *P. serpens* 15T não possui proteína similar com a cruzipaína de *T. cruzi*, um dos principais fatores de virulência do protozoário causador da doença de Chagas. O anticorpo monoclonal murino mAb CZP-315.D9 (BATISTA et al., 2014), que reconhece especificamente reservossomos, não identificou a molécula no fitoflagelado. Este dado reforça o uso de tripanossomatídeos de plantas como uma fonte segura de agentes imunogênicos para o tratamento e prevenção da doença de Chagas.

2. Material e métodos

2.1 Microrganismos

Trypanosoma cruzi Y

Formas epimastigotas foram mantidos em cultivo axênico, segundo Camargo (1964) em meio LIT (5 g/L de infusão de fígado; 4,4 g/L de NaCl; 0,4 g/L de KCl; 2,2 g/L de glicose; 5 g/L de triptose; 11,56 g/L de NaHPO₄; 15 g/L de extrato de levedura; 0,02 g/L de hemina; soro bovino fetal 10% (Invitrogen); penicilina (200 UI/mL) e incubadas a 28 °C, com passagens a cada quatro dias.

Phytomonas serpens 15T

Formas promastigotas, isoladas de *Lycopersicum esculentum* em Londrina, Paraná, Brasil, foram mantidas a 28°C em meio GYPMI (10,0 g/L de glicose, 2,5 g/L de extrato de levedura, 2,5 g/L peptona, 20% de infusão de carne, 0,001% hemina, 10,0 g/L KCl, 8,5 g/L NaCl pH 7.0) (JANKEVICIUS et al., 1989).

2.2 Ensaios de reatividade para detecção da proteína cruzipaína em *T. cruzi* Y e em *P.*

serpens 15T.

1×10^8 formas, epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *P. serpens*, foram ressuspensas em solução de lise (Tris-HCl 50 mM pH 7,0; DTT 4,1 mM; sacarose 3,1 mM; 10 μ g/mL leucopeptina; 10 μ g/mL inibidor de tripsina; 2 μ g/mL aprotinina; Triton X-100 0,1%). A concentração proteica dos extratos foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). As proteínas foram separadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 13%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond-C (Amersham) em tampão de transferência (Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,19 M, metanol 20%), conforme descrito por Towbin e colaboradores (1979). A membrana foi incubada em um tampão de bloqueio PBS/Tween 20 0,05% leite desnatado 5% durante 18 h a 4 °C. Em seguida, o anticorpo de camundongo anti-cruzipaína mAb CZP-315.D9 (BATISTA et al., 2014) diluído (1:500) foi adicionado e incubado por 2 h a 37 °C, com agitação constante. Após três lavagens com PBS/Tween 20 0,05% foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (diluição 1:8000) por 1 h a 37 °C sob agitação. A seguir, a membrana foi lavada na condição acima descrita e os anticorpos foram detectados após incubação em a solução de revelação (6 mg de 4-cloro-1-naftol; 2 mL de metanol; 10 mL de PBS; 10 μ L de H₂O₂ 30%), a reação foi finalizada após lavagem em água destilada.

2.3 Imunolocalização celular da proteína cruzipaína em *T. cruzi* Y e em *P. serpens 15T*.

Formas epimastigotas de *T. cruzi* e formas promastigotas de *P. serpens* foram centrifugadas, lavadas duas vezes, fixadas em paraformaldeído 4% em PBS e aderidas por 10 min em temperatura ambiente em lâminas previamente preparadas com poli-L-lisina conforme descrito por Holetz e colaboradores (2007). Posteriormente as lâminas foram lavadas com PBS e bloqueadas com PBS-BSA 4% a 4 °C por 16 h em câmara úmida. O anticorpo primário anti-cruzipaína mAb CZP-315.D9 (diluição 1:500) foi adicionado e incubado por 1 h a 37 °C, os poços foram lavados e acrescido o anticorpo secundário conjugado com Alexa- 633 diluído 1:400, em seguida as lâminas foram lavadas com PBS. Para coloração de ácidos nucleicos, foi acrescentado DAPI (estoque 1 g/mL), na diluição 1:1000, em temperatura ambiente, por 5 min, seguindo de lavagens com PBS. Foi adicionado N-propil-galato e as lâminas foram finalizadas utilizando lamínulas de microscopia e selador. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (Nikon E600), as imagens capturadas com câmera CoolSnap PROcf (Media Cybernetics) e analisadas com o programa Image Pro-Plus v.4.5.1.22 (Media Cybernetics).

2.4 Análise dos transcritos do gene que codifica a cruzipaína em *T. cruzi* Y e em *P. serpens* 15T.

Cerca de 1×10^8 parasitos foram centrifugados, lavados em PBS, ressuspensos em solução de TRIzol e processados conforme a metodologia indicada pelo fabricante (Invitrogen). As amostras de RNA foram submetidas a eletroforese de gel de agarose 1% (contendo MOPS 1x e formaldeído 10,8%) em tampão MOPS 1x. As moléculas de RNA foram transferidas para filtro de náilon (Hybond N, Amersham) por capilaridade por 16 h em solução de SSC 20x. A membrana foi lavada em uma solução de SSC 6x por 5 min e o material genético foi fixado à membrana por exposição à luz ultravioleta por 3 min. O gene de cruzipaína de *T. cruzi* foi marcado com nucleotídeo radioativo segundo protocolo do fabricante kit *Nick translation system* (Invitrogen). Para a verificação da incorporação de radioatividade do DNA, 1 μ L da amostra foi submetido a contagem da radiação em um contador de cintilação beta (Beckmann). A membrana foi pré-hibridada com solução de hibridação (formamida 50%; tampão Denhardt 5x; SSC 5x; DNAss 100 μ g/mL; tRNA 3 μ g/mL) a 42 °C por 2 h e hibridados por 16 h a 42 °C com a sonda marcada com [α - 32 P] dCTP. Após a incubação, o filtro foi lavado por 30 min com tampão de lavagem 2x (SSC 2x; SDS 0,1%; NaPi 0,1%) a 42 °C, tampão de lavagem 0,2x (SSC 1x; SDS 0,1% NaPi 0,1%) a 56 °C e tampão de lavagem 0,2x (SSC 0,1x; SDS 0,1%, NaPi 0,1%) a 65 °C. A membrana foi exposta a um filme de raio-X (X-omat Kodak) por diferentes tempos e revelados e fixados com soluções próprias (Kodak).

3. Resultados e discussão

É comum a expressão de antígenos com semelhanças antigênicas em diferentes espécies de tripanossomatídeos. Neste contexto, sabe-se que *Phytomonas serpens* compartilha antígenos com outros importantes tripanossomatídeos, como *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* (BREGANÓ et al., 2003; DA SILVA et al., 2013; GRAÇA et al., 2010; PINGE-FILHO et al., 2005; SANTOS et al., 2006, 2007).

Em *T. cruzi* a mais abundante é a cruzipaína, responsável pela maior parte da atividade proteolítica em todas as fases do ciclo evolutivo do parasito (CAMPETELLA; MARTINEZ; CAZZULO, 1990).

Cruzipaína é uma glicoproteína que é processada no complexo de Golgi e, em seguida, dirigida para o sistema endossomal/lisossomal, através da rede trans-Golgi (ANITEI; HOFLACK, 2011; MATTEIS; LUINI, 2008). Esta cisteína protease possui três domínios

proteicos: pré-pro-catalítico e extensão C-terminal (EAKIN et al., 1992). O mAb CZP-315.D9 é capaz de reconhecer os domínios da proteína por Western blot em extratos de epimastigotas de *T. cruzi* (BATISTA et al., 2014).

Assim, inicialmente foi realizado um ensaio de reatividade do anticorpo anti-cruzipaína mAb CZP-315.D9 com extratos totais de epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *P. serpens*. O resultado mostra o reconhecimento pelo anticorpo mAb CZP-315.D9 principalmente de uma proteína com cerca de 50 kDa no extrato proteico de *T. cruzi*, no entanto, nenhuma proteína no extrato de *P. serpens* foi reconhecida (Figura 1). A proteína reconhecida em *T. cruzi* tem a massa molecular do precursor de cruzipaína, calculado em 49765 daltons (Genbank acesso número XP_818579)



Figura 1: Análise da reatividade cruzada entre *P. serpens* e o anticorpo mAb CZP-315.D9 anti-cruzipaína de *T. cruzi*. Os extratos de proteína total de epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *P. serpens* foram separados em SDS-PAGE 13%, transferidos para nitrocelulose e incubados com mAb CZP-315.D9.

Este resultado contradiz o trabalho de Elias e colaboradores (2008), onde é mostrado a presença de cisteínas peptidases com similaridades a cruzipaína em *P. serpens*. No entanto, os ensaios realizados foram indiretos, ou seja, não há o isolamento e caracterização da protease. Além disso, a ausência de reconhecimento pelo anticorpo pode ter ocorrido devido a denaturação da proteína através dos tampões utilizados, perdendo a conformação original. Assim, ensaios de imunolocalização celular de cruzipaína em formas epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *P. serpens* foram realizadas para verificar a presença desta proteína na conformação correta nos parasitos. Os nossos resultados confirmaram os resultados

anteriores onde o anticorpo monoclonal reconheceu antígenos apenas em *T. cruzi* (Figura 2), a imunolocalização mostrou a presença em estruturas redondas possivelmente os reservossomos no final posterior nas formas epimastigotas de *T. cruzi* (Figura 2) como os achados por Batista e colaboradores (2014). Não observamos nenhuma marcação do anticorpo em *P. serpens*. Nenhuma marcação foi observada no controle da reação quando utilizou-se apenas o anticorpo secundário (Alexafluor 633).

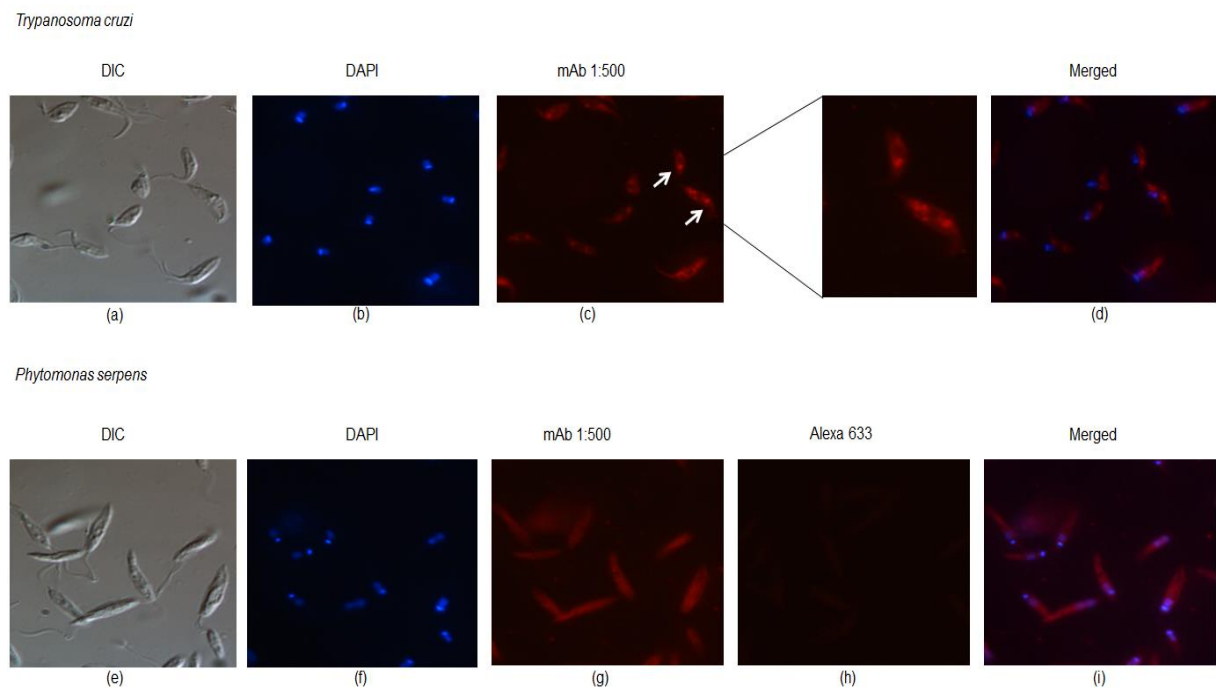


Figura 2: Imunolocalização de cruzipaína em *T. cruzi* e *P. serpens* pelo anticorpo mAb CZP-315.D9. Parasitos foram fixados e observados em microscópio de fluorescência. DIC: contraste por interferência diferencial (a, e). DAPI: DNA marcado com DAPI (b, f). mAb 1:500: incubação com mAb anti-cruzipaína (c, g). Alexa 633: incubação somente com o anticorpo secundário (h). Sobreposição de imagens DAPI/mAb (d, i)

As diferenças entre os resultados obtidos no presente trabalho e dados da literatura pode ser devido a utilização de anticorpos preparados de forma distintas. A marcação de imunofluorescência realizada no artigo de Elias e colaboradores (2008) utilizou um anticorpo policlonal monoespecífico anti-cruzipaína produzido em coelho, já o anticorpo utilizado neste trabalho foi um anticorpo monoclonal anti-cruzipaína produzido em camundongo. Como este último reconhece apenas um epítipo, diferente do anticorpo policlonal, a falha na reatividade pode ser devido a ausência deste epítipo na proteína de *P. serpens*.

Assim para confirmar a presença ou não do gene que codifica para cruzipaína em *P. serpens*, foi realizada pela técnica de Northern blot a análise da transcrição do gene. Os resultados mostram que em *T. cruzi* há quatro transcritos, mas nenhuma marcação foi encontrada nos RNAs de *P. serpens*, evidenciando assim que este não transcreve o gene que codifica cruzipaína (Figura 3).

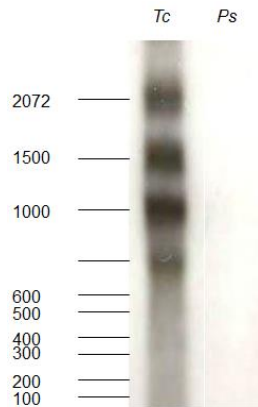


Figura 3: Análise de Northern blot de RNA extraído de formas promastigotas de *P. serpens* 15T. 10 µg de RNA total foi separado em condições desnaturantes, transferido para membrana de náilon e hibridado com sonda específica.

Neste estudo não conseguimos identificar em *P. serpens* 15T uma cisteína protease com similaridade a cruzipaína de *T. cruzi*. No entanto, não descartamos que este parasito apresente outras cisteínas proteases uma vez que os dados apresentados por Elias e colaboradores (2008) mostram claramente a atividade desta enzima em *P. serpens* 9T. Destaca-se também a utilização de dois isolados diferentes, assim, mais estudos devem ser realizados para verificar e caracterizar cisteínas proteases presentes em *P. serpens* 15T a fim de elucidar as diferenças entre os estudos dos diferentes isolados.

Referências

- ANITEI M, HOFLACK B Exit from the trans-Golgi network: from molecules to mechanisms. *Curr Opin Cell Biol.* Aug;23(4):443-51, 2011.
- BATISTA CM, MEDEIROS LC, EGER I, SOARES MJ. mAb CZP-315.D9: an antirecombinant cruzipain monoclonal antibody that specifically labels the reservosomes of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biomed Res Int.* 2014: 714749, 2014.
- BREGANÓ, J.W.; PICÃO, R.C.; GRAÇA, V.K.; MENOLLI, R.A.; ITOW JANKEVICIUS, S.; PINGE FILHO, P.; JANKEVICIUS, J.V. *Phytomonas serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Dec 5;39(3):257-64, 2003.
- CAMPETELLA O, MARTÍNEZ J, CAZZULO JJ. A major cysteine proteinase is developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett.* Jan 15;55(1-2):145-9, 1990.
- CAZZULO JJ. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Top Med Chem.* Nov;2(11):1261-71, 2002.
- DA SILVA, R.V.; MALVEZI, A.D.; AUGUSTO, L.D.A. S.; KIAN, D.; TATAKIHARA, V. L.; YAMAUCHI, L.M.; YAMADA-OGATTA, S.F.; RIZZO, L.V.; SCHENKMAN, S.; PINGE-FILHO, P. Oral exposure to *Phytomonas serpens* attenuates thrombocytopenia and leukopenia during acute infection with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One.* Jul 2;8(7):e68299, 2013.
- DE MATTEIS MA, LUINI A Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Apr;9(4):273-84, 2008.
- EAKIN AE, MILLS AA, HARTH G, MCKERROW JH, CRAIK CS The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* Apr 15;267(11):7411-20, 1992.

GONÇALVES, C.C.; REICHE, E.M.; DE ABREU FILHO, B.A.; SILVEIRA, T.G.; FELIZARDO, T.C. et al. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a Western blot for diagnosis of American tegumentar leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66:91-102, 2002.

GRAÇA-DE SOUZA, V.K.; MONTEIRO-GOES, V.; MANQUE, P.; SOUZA, T.A.; CORREA P.R. et al. Sera of chagasic patient react with antigens from the tomato parasite *Phytomonas serpens*. *Biological Research* 43:233-241, 2010.

HOLETZ FB, CORREA A, AVILA AR, NAKAMURA CV, KRIEGER MA, GOLDENBERG S. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun.* May 18;356(4):1062-7, 2007.

JANKEVICIUS, J.V.; JANKEVICIUS, S.I.; CAMPANER, M.; CONCHON, I.; MAEDA, L.A.; TEIXEIRA, M.M.G.; FREYMULLER, E.; CAMARGO, E.P.; Life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes, *J. Protozool.* 36. 265-271, 1989.

JUNQUEIRA, C.; CAETANO, B.; BARTHOLOMEU, D.C.; MELO, M.B.; ROPERT, C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 12:e29, 2010.

LOPES, J.D.; CAULADA, Z.; BARBIERI, C.L.; CAMARGO, E.P. Cross-reactivity between *Trypanosoma cruzi* and insect trypanosomatids as a basis for the diagnosis of Chagas' disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30:1183-1188, 1981.

MONCAYO, A.; ORTIZ, YANINE, M.I. An update on Chagas' disease (human American trypanosomiasis). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 100:663-677, 2006.

NOGUEIRA DE MELO AC¹, D'AVILA-LEVY CM, DIAS FA, ARMADA JL, SILVA HD, LOPES AH, SANTOS AL, BRANQUINHA MH, VERMELHO AB. Peptidases and gp63-like proteins in *Herpetomonas megaseliae*: possible involvement in the adhesion to the invertebrate host. *Int J Parasitol.* Apr;36(4):415-22, 2006.

OSORIO, L.; RÍOS, I.; GUTIÉRREZ, B.; GONZÁLEZ, J. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who?. *Microbes and Infection* 14, 1390-1402, 2012.

PINGE-FILHO, P.; PERON, J.P.; DE MOURA, T.R.; MENOLLI, R.A.; GRAÇA, V.K.; ESTEVÃO, D.; TADOKORO, C.E.; JANKEVICIUS, J.V.; RIZZO, L.V. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* provided by oral immunization with *Phytomonas serpens*: role of nitric oxide. *Immunol Lett.* Jan 31;96(2):283-90, 2005.

PY, M. Neurologic Manifestations of Chagas Disease. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 11: 536-542, 2011.

RASSI, A. Jr.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. *Lacert* 375:1388-1402, 2010.

SANTOS AL, D'AVILA-LEVY CM, DIAS FA, RIBEIRO RO, PEREIRA FM, ELIAS CG, SOUTO-PADRÓN T, LOPES AH, ALVIANO CS, BRANQUINHA MH, SOARES RM. *Phytomonas serpens*: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion. *Int J Parasitol.* Jan;36(1):47-56, 2006.

SANTOS, A.L.; D'AVILA-LEVY, C.M.; ELIAS, C.G.; VERMELHO, A.B.; BRANQUINHA, M.H. *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. *Microbes Infect.* Jul; 9(8):915-21, 2007.

SANTOS, A.L.S.; D'AVILA-LEVY, C.M.; DIAS, F.A.; RIBEIRO, R.O.; PEREIRA, F.M.; ELIAS, C.G.; SOUTO-PADRÓN, T.; LOPES, A.H.; ALVIANO, C.S.; BRANQUINHA, M.H.; SOARES, R.M. *Phytomonas serpens*: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion. *Int J Parasitol;* Jan; 36 (1):47-56, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; CARVALHO, N.B. Oral transmission of Chagas Disease. *Clinical Infectious Diseases* 54:845-852, 2012.

TOSO, A.; VIAL, F.; GALANTI, N. Oral transmission of Chagas' disease. *Revista Medica de Chile* 139:258-266, 2011.

TOWBIN H, STAEBELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep;76(9):4350-4, 1979.

VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *International Journal for Parasitology* 24:1317-1331, 1994.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A imunização com *P. serpens* 15T aumentou a produção de NO no coração de animais imunizados e desafiados em comparação com camundongos não imunizados;
- Menor carga parasitária no coração de camundongos imunizados e infectados por *T. cruzi*, correlaciona-se com maior produção de NO e citocinas inflamatórias no soro;
- *P. serpens* 15 T não possui cisteína protease com similaridade a cruzipaina de *T. cruzi*;
- Espécies de tripanossomatídeos fitoflagelados como *P. serpens*, podem ser uma fonte de agentes imunogênicos para opções terapêuticas na cardiopatia chagásica.