

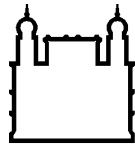
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FIBRÓCITOS MURINOS E TESTE DE
SENSIBILIDADE DE INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi***

HENRIQUE PREVITALI DA SILVA

Rio de Janeiro
Agosto de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

HENRIQUE PREVITALI DA SILVA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FIBRÓCITOS MURINOS E TESTE DE
SENSIBILIDADE DE INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo
Cruz como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kátia da Silva Calabrese

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2018

PREVITALLI DA SILVA, HENRIQUE .

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FIBRÓCITOS MURINOS E
TESTE DE SENSIBILIDADE DE INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi* /
HENRIQUE PREVITALLI DA SILVA. - Rio de Janeiro, 2018.

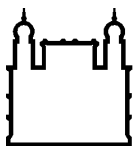
75 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Medicina Tropical, 2018.

Orientadora: KÁTIA DA SILVA CALEBRESE.

Bibliografia: f. 46-60

1. *T. cruzi*. 2. *Fibrócitos*. I. *Título*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: HENRIQUE PREVITALI DA SILVA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FIBRÓCITOS MURINOS E TESTE DE
SENSIBILIDADE DE INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi*

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Kátia da Silva Calabrese

Aprovada em: ____ / ____ / ____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado – Presidente (Instituto Oswaldo Cruz-IOC)

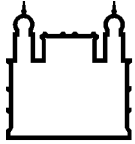
Prof. Dr. Jacenir Reis dos Santos Mallet (Instituto Oswaldo Cruz-IOC)

Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello (UERJ)

Prof. Dr. Marcia Pereira de Olivera Duarte (Instituto Oswaldo Cruz-IOC)

Prof. Dr. Maria Denise Feder (UFF)

Rio de Janeiro, 07 de agosto de 2018.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, ao meu pai Devair, minha mãe Jane, aos meus familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus sobre todas as coisas, por seu amor incondicional.

À Dra. Kátia da Silva Calabrese, chefe do Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia da FIOCRUZ/IOC pela orientação, e conhecimentos transmitidos ao longo desse tempo.

À Msc. Daiana de Jesus Hardoim, por sua disposição, ajuda, paciência e ensinamentos em todos os momentos.

À Dra. Celeste da Silva Freitas de Souza pela contribuição, apoio, incentivo e caronas ao longo desse tempo.

A todos do laboratório de Imunomodulação e Protozoologia da FIOCRUZ/IOC, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Marcelo Pelajo Machado do Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz pelo apoio científico e revisão desta dissertação.

À Dra Ester Maria Mota do Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz pela ajuda no desenvolvimento da técnica de imunofluorescência.

À Plataforma Tecnológica de Microscopia Confocal, da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Aos meus amigos de todas as horas, e que sempre estão por perto, que algumas vezes até sem saber muito me ajudaram, vocês são imprescindíveis na minha vida.

Ao amigo Thiago de Souza Dias Silva por toda ajuda dispensada, apoio, incentivo e amizade em todos os momentos.

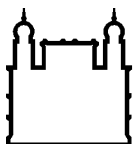
Aos meus pais, Devair e Jane, que não tenho palavras para agradecer por tamanho amor, incentivo e apoio incondicional.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dessa dissertação.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

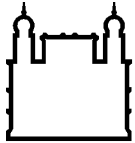
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FIBRÓCITOS MURINOS E TESTE DE SENSIBILIDADE DE INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Henrique Previtalli da Silva

Os fibrócitos são células de origem hematopoiética, com propriedades pró-inflamatórias semelhantes às dos macrófagos e propriedades de remodelamento teciduais dos fibroblastos. Diversas condições de cultivo *in vitro* têm sido usadas para gerar fibrócitos humanos, murinos e suínos. Os protocolos desenvolvidos por Bucala e colaboradores (1994) vêm sendo usados como base para esse cultivo, contudo, variações nesses protocolos vêm sendo realizadas para a melhoria na obtenção destes fibrócitos. A tripanossomíase americana ou doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, há mais de um século após sua descoberta, ainda é considerada um importante problema social e de saúde pública. A fibrose, uma das manifestações mais significativas da cardiopatia chagásica crônica, encontra-se associada a infiltrados inflamatórios e cardiomiócitos em degeneração. Evidências têm sugerido a participação de outras células neste processo, como células endoteliais e fibrócitos circulantes. Tem sido extensamente descrito na literatura que fibrócitos do sangue periférico, produtores de matriz extracelular, podem contribuir para o desenvolvimento de fibrose pulmonar, renal e cardíaca. Estas células estão significativamente aumentadas no coração de indivíduos acometidos por isquemia cardíaca, hipertensão e fibrilação atrial, o que nos leva a pensar que podem estar presentes também nas lesões fibróticas da cardiopatia chagásica crônica e que podem ser um alvo potencial para o tratamento da fibrose cardíaca. Diante disso, o presente estudo padronizou um protocolo de obtenção e estabelecimento de fibrócitos murinos em cultura e investigou se o *T. cruzi* é capaz de infectar estas células. Desta forma, para padronização da obtenção dos fibrócitos, diferentes protocolos de obtenção de PBMCs, a partir de sangue periférico de camundongos *Swiss Webster* foram testados, assim como diferentes anticoagulantes, meios de cultura e suplementação com SFB. Após o estabelecimento do protocolo, investigamos a possibilidade de infecção dos fibrócitos pela cepa SC2005 de *T. cruzi*. Os resultados mostraram que o uso do EDTA como anticoagulante proporcionou uma melhor obtenção de PBMCs e o meio de cultura DMEM/F-12 sem SFB foi o melhor para o estabelecimento e diferenciação dos fibrócitos. A caracterização dos fibrócitos foi realizada por imunofluorescência com marcações para CD11b, CD45, colágenos I, III, IV e fibronectina, sendo apenas esta última negativa. Os ensaios de infecção celular pelo *T. cruzi* mostraram um aumento gradativo no número de células infectadas até 24h, e um aumento no número de amastigotas entre 2 e 72h. A avaliação da produção de óxido nítrico foi semelhante em fibrócitos infectados e não infectados. Concluímos que a obtenção dos fibrócitos a partir de PBMCs depende não só do processamento sanguíneo, como também da composição do meio utilizado no cultivo das células e que o *T. cruzi* é capaz de infectar essas células de forma progressiva, com multiplicação crescente do número de amastigotas intracelulares. Outros estudos devem ser realizados para embasar os efeitos da infecção por *T. cruzi* nestas células.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MURIN FIBROCYTES AND TEST OF INFECTION SENSITIVITY BY *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Henrique Previtalli da Silva

Fibrocytes are hematopoietic origin cells, with macrophages proinflammatory properties and fibroblast tissue remodeling properties. Various in vitro culture conditions have been used to generate human, murine and swine fibrocytes. Many protocols have been used to fibrocytes cultivation, however, variations in these protocols have been carried out to improve the collection of these cells. American trypanosomiasis or Chagas disease, caused by the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma cruzi*, more than a century after its discovery, it is still considered an important social and public health problem. Fibrosis is one of the most significant manifestations of chronic chagasic cardiopathy and is associated with inflammatory infiltrates and degenerating cardiomyocytes. Evidence has suggested the involvement of other cells in this process, such as endothelial cells and circulating fibrocytes. It has been extensively described in the literature that peripheral blood fibrocytes, extracellular matrix producers, may contribute to the development of pulmonary, renal and cardiac fibrosis. These cells are significantly increased in the heart of individuals affected with cardiac ischemia, hypertension and atrial fibrillation, which leads us to believe that they may also be present in the fibrotic lesions of chronic chagasic cardiopathy and may be a potential target for the treatment of cardiac fibrosis. Therefore, the present study standardized a protocol for obtaining and establishing murine fibrocytes in culture and investigated whether *T. cruzi* is capable of infecting these cells. Thus, for standardization of fibrocyte production, different protocols for obtaining PBMCs, from peripheral blood of Swiss Webster mice, were tested, as well as different anticoagulants, culture media and supplementation with SFB. After establishing the protocol, we investigated the possibility of infection of the fibrocytes by *T. cruzi* SC2005 strain. The results showed that EDTA was better at obtaining the PBMCs and the DMEM/F-12 culture medium, without SFB, was the best for fibrocyte establishment. Fibrocyte characterization was performed by immunofluorescence with labels for CD11b, CD45, collagens I, III, IV and fibronectin, only the latter being negative. The *T. cruzi* cell infection assays showed a gradual increase in the number of infected cells up to 24h, and an increase in the number of amastigotes between 2 and 72h. The evaluation of nitric oxide production was similar in both infected and not infected fibrocytes. We conclude that obtaining the fibrocytes from PBMCs depends not only on the blood processing, but also on the composition of the medium used in cell culture and that *T. cruzi* is capable of infecting these cells progressively, with increasing multiplication of the number of intracellular amastigotes. Further studies should be performed to support the effects of *T. cruzi* infection on these cells.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas	1
1.2 O Parasito	1
1.3 Vetores	4
1.4 Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> e formas de transmissão.....	5
1.5 Patogenia da doença de Chagas e persistência do <i>T. cruzi</i> nos tecidos.....	8
1.6 Tratamento	11
1.7 O processo fibrótico na doença de Chagas.....	13
1.8 Fibrócitos	13
2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo Geral	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Animais	19
4.2 Padronização dos protocolos	19
4.2.1 Rendimento celular	19
4.2.2 Obtenção de PBMCs	20
4.2.3 Meio de cultura e concentração de SFB	20
4.2.4 Concentração de PBMCs.....	20
4.2.5 Remoção de plaquetas	20
4.3 Obtenção e cultura de fibrócitos.....	21
4.4 Imunofluorescência.....	22
4.5 Parasitos	22
4.5.1 Cultivo e manutenção dos parasitos	23
4.5.2 Obtenção de formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> derivadas de cultura de células (TCC).....	23
4.6 Infecção dos fibrócitos murinos	24

4.7	Dosagem de óxido nítrico (NO).....	25
4.8	Análise estatística	25
5	RESULTADOS	26
5.1	Padronização dos Protocolos	26
5.1.1	Rendimento celular	26
5.1.2	Obtenção de PBMCs	26
5.1.3	Meio de cultura e concentração de SFB	26
5.1.4	Concentração de PBMCs.....	27
5.1.5	Remoção de plaquetas	27
5.2	Imunofluorescência.....	28
5.3	Infecção de Fibrócitos Murinos.....	30
5.4	Dosagem de Óxido Nítrico (NO).....	35
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÕES	45
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
9	ANEXOS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1- Representação esquemática de epimastigota do *T. cruzi*.

Figura 1.2- Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* adaptado de Pérez-Molina & Molina, 2017.

Figura 1.3- Expressão de marcadores de monócitos, macrófagos, fibrócitos e fibroblastos.

Figura 5.1 - Imunofluorescência.

Figura 5.2 - Cinética de infecção.

Figura 5.3 - Porcentagem de infecção

Figura 5.4 - Média de amastigotas intracelular.

Figura 5.5 - Índice de infecção.

Figura 5.6 - Análise quantitativa da produção de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de fibrócitos murinos infectados com formas tripomastigotas derivadas de cultura de células (TCC), do isolado SC2005 de *T. cruzi*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da remoção de plaquetas munofluorescência

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*

µm – Micrômetro

DNA – Ácido desoxirribonucleico

kDNA – DNA do cinetoplasto

AVC – Acidente vascular cerebral

PCR – Polimerase chain reaction

CCC – Cardiomiopatia chagásica crônica

DCA – Doença de Chagas crônica

WHO – World health organization

BENEFIT – Benznidazol evaluation for interrupting trypanosomiasis

NO – Óxido nítrico

PBMC – Peripheral blood mononuclear cell

SW – *Swiss webster*

ICTB – Instituto de ciências e tecnologia em biomodelos

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid

SFB – Soro fetal bovino

PBS – Phosphate buffered saline

DMEM – Dulbecco's modified eagle's medium

DMEM/F-12 – Dulbecco's modified eagle's medium/nutrient mixture F-12 Ham

ACK – Ammonium chloride potassium

PFA – Paraformoldeído

BSA – Bovine serum albumin

FITC – Fluorescein isothiocyanate

VERO – Células do epitélio renal de macaco verde africano, *Cercopithecus aethiops*

LIT – Liver infusion triptose

TCC – *Trypanosoma cruzi* derivado de cultura de células

ROS – Reactive oxygen species

FIG. – Figura

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas foi descrita em 1909 por Carlos Ribeiro Justino das Chagas e, passados mais de um século da sua descoberta, ainda é considerada um importante problema social e de saúde pública, não apenas na América Latina, onde é endêmica, mas também na Europa, América do Norte, Japão e Austrália, devido principalmente à migração (Gascon et al., 2010; Jackson et al., 2014; WHO, 2017), e aos processos internacionais de adoção e viagens a áreas endêmicas (Filigheddu et al., 2017; WHO, 2017).

Estima-se que cerca de 8 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* em todo o mundo, sendo a maioria residente nas áreas endêmicas de 21 países nas Américas Central e do Sul (Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela) (WHO, 2017), causando incapacidade em indivíduos infectados e mais de 10.000 óbitos por ano (WHO, 2017). Acredita-se que existam cerca de 400.000 pessoas infectadas vivendo em países não endêmicos, principalmente nos Estados Unidos e Europa (Pinazo et al. 2011; Bern, 2015).

A incidência da doença de Chagas anual é de aproximadamente 28.000 casos com cerca de 7.000 mortes ao ano, sendo considerada a doença parasitária que mais leva a óbito na América Latina. Nas Américas, cerca de 65 milhões de pessoas estão susceptíveis a contrair essa doença (PAHO, 2016; Chatelain, 2017). A Argentina, o Brasil e o México são os três países com o maior número estimado de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, com 26%, 20% e 15% do total de pessoas infectadas, respectivamente (WHO, 2015; Dias et al., 2016).

1.2 O Parasito

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado que apresenta diferentes formas evolutivas durante seu ciclo de vida, desenvolvendo-se em diversas espécies

de hospedeiros vertebrados e invertebrados. As formas amastigotas têm cerca de 5 µm de diâmetro, formato esférico ou oval, cinetoplasto visível, corpo achatado com flagelo não exteriorizado, restrito à bolsa flagelar. As formas epimastigotas têm de 20 a 40 µm de comprimento, com cinetoplasto posicionado anteriormente ao núcleo e flagelo livre. As formas tripomastigotas possuem cerca de 25 µm de comprimento e caracterizam-se por apresentar cinetoplasto posterior ao núcleo e flagelo livre. (Hoare, 1972; Tyler & Engman, 2001; Burleigh & Woolsey, 2002). O *Trypanosoma cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida, que inclui organismos que apresentam um único flagelo e uma mitocôndria que percorre toda extensão celular. Essa mitocôndria contém uma rede complexa e compactada de moléculas circulares de DNA, denominada de cinetoplasto ou kDNA. Este é composto por centenas de moléculas de DNA circulares, denominadas maxi e minicírculos e representa aproximadamente 20 a 30% do DNA total do parasito (Cano et al., 1995; Shapiro & Englund, 1995; Sibley, 2011; Tomasini, 2018).

Parasitas incluídos nesta ordem apresentam ainda outras estruturas e organelas intracelulares especializadas como glicosomos, citóstomo, reservossomo, acidocalcissoma e vacúolo contrátil (De Souza, 2009; Castro & Menna-Barreto, 2017). Além disso, um conjunto de microtúbulos subpeliculares em arranjo helicoidal, confere rigidez ao parasito, assegurando a manutenção da sua forma, que varia dependendo da fase do ciclo de vida em que se encontra. A presença de microtúbulos dificulta invaginações da membrana na maior parte do corpo celular, entretanto, estão ausentes na região da bolsa flagelar, de onde o flagelo emerge do corpo. As formas epimastigotas e amastigotas, apresentam na região anterior do corpo, próximo à abertura da bolsa flagelar, o citóstomo, estrutura responsável pela maior parte da atividade endocítica do *T. cruzi*. Esta região é sustentada por microtúbulos especializados, pobre em proteínas integrais de membrana, o que o diferencia do restante da membrana (De Souza, 2009; Castro & Menna-Barreto, 2017).

O flagelo, presente em todas as formas evolutivas do *T. cruzi*, emerge da bolsa flagelar e é composto por um axonema típico formado por nove pares de microtúbulos periféricos e um par central, envolvido pela membrana flagelar e associado a um corpúsculo basal. As formas epimastigotas e tripomastigotas possuem ao lado do axonema uma estrutura complexa chamada de corpo paraxial

ou estrutura paraflagelar (Bastinet et al., 1999). Nas formas amastigotas o flagelo é muito curto, muitas vezes permanecendo no interior da bolsa flagelar, nas formas epimastigota e tripomastigota, parte do flagelo encontra-se aderida ao corpo celular, permitindo um leve movimento associado ao batimento flagelar, o que confere a impressão da existência de uma membrana ondulante (Carvalho, 2017).

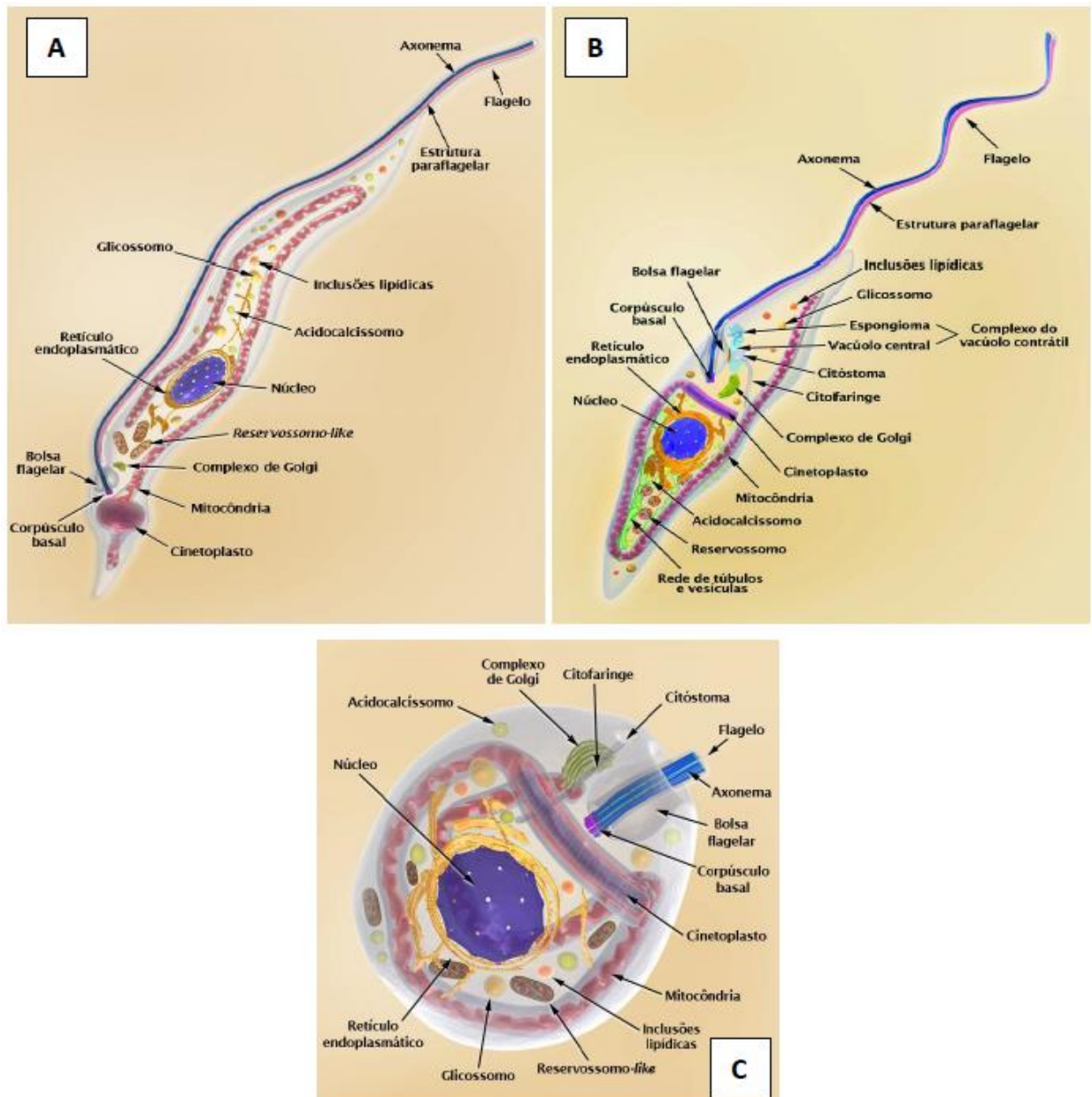


Figura 1.1- Representação esquemática de tripomastigota, epimastigotas e amastigota do *T. cruzi*.

Representação esquemática de tripomastigotas (A), epimastigotas (B) e amastigota (C) do *T. cruzi* demonstrando estruturas e organelas intracelulares especializadas como glicossomos, citóstomo, reservossomo, acidocalcissoma, vacúolo contrátil, um

conjunto de microtúbulos subpeliculares, axonema, estrutura paraflagelar, bolsa flagelar, cinetoplasto, mitocôndria, acidocalcisomo, Golgi, núcleo, nucléolo. Fonte: Lechuga,2011.

1.3 Vetores

Insetos hematófagos da subfamília *Triatominae* são responsáveis pela transmissão vetorial do *T. cruzi*. A doença de Chagas, anteriormente definida como uma enzootia restrita a ambientes silvestres, hoje é considerada uma antropozoonose, devido a intervenções humanas no meio ambiente, tais como expansão da fronteira agrícola e migrações internas. Como resultado das ações humanas sobre o ambiente, os vetores foram deslocados dos seus nichos silvestres originais, adaptando-se a outras fontes alimentares, dentre elas o sangue humano e de animais domésticos, ocasionando assim sua domiciliação (Argolo et al., 2008; Coura & Borges-Pereira, 2010; Justi & Galvão, 2017).

A principal espécie responsável pela transmissão vetorial do *T. cruzi* no Brasil foi, durante algum tempo, o *Triatoma infestans*, inseto de hábito essencialmente domiciliar que teve sua dispersão facilitada pelos fatores já mencionados. Entretanto, ações sistematizadas de programas regionais, visando o controle químico do vetor, como as ocorridas nos países do Cone Sul, do Pacto Andino e América Central, mostraram um efeito positivo significativo na ocorrência de novos casos da doença, que passaram de 700.000 em 1990 para 41.200 em 2006. Tais ações conferiram ao Brasil, em 2006, uma certificação internacional pela interrupção da transmissão da doença de Chagas pelo *T. infestans* (Ministério da Saúde, 2015; WHO, 2017). Além disso, também foi alcançada, em 2010, a interrupção da transmissão vetorial pelo vetor *Rhodnius prolixus* em todos os países da América Central, além de Costa Rica, El Salvador e México (Hashimoto & Schofield, 2012).

Apesar do controle da transmissão de *T. cruzi* pelos principais espécies de triatomíneos, vetores secundários como *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida*, ainda desempenham um importante papel na transmissão do parasito para o homem (Justi & Galvão, 2017). A maioria das espécies de vetores conhecidas vive no meio silvestre. No entanto,

ainda podem ser encontradas em distintas regiões do Brasil diferentes espécies de triatomíneos habitando regiões domiciliares e peridomiciliares (Ministério da Saúde, 2009).

1.4 Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* e formas de transmissão

Sendo um parasito heteroxênico, o ciclo natural do *T. cruzi* apresenta uma fase replicativa e intracelular no hospedeiro vertebrado e outra extracelular no inseto vetor.

No inseto vetor, a primeira diferenciação dos parasitos ocorre no lúmen do seu trato gastrintestinal, onde formas tripomastigotas sanguícolas, adquiridas de um hospedeiro vertebrado infectado, transformam-se em formas epimastigotas (não infectivas). A seguir, essas formas migram para o reto e aderem à glândula retal. Neste local, ocorre a segunda diferenciação, em formas tripomastigotas metacíclicas (formas infectivas), por um processo de diferenciação celular denominado de metaciclogênese (Zeledón, et al., 1984; Coura & Borges-Pereira, 2012). Essas formas são eliminadas junto às fezes e urina do inseto vetor durante ou após o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado. Estas formas infectivas podem, então, entrar em contato com áreas de descontinuidade da pele ou através das mucosas desses hospedeiros e invadir células próximas. Dentro da célula, os tripomastigotas são envoltos pelo vacúolo parasitóforo, dando início a diferenciação para formas amastigotas. Enzimas liberadas pelos parasitos rompem o vacúolo e eles escapam para o citoplasma da célula hospedeira e aí se dá a diferenciação completa para as formas amastigotas, que se multiplicam por divisão binária (De Souza 2009). Após a replicação, inicia-se um processo inverso de transformação, as formas amastigotas voltam a ser tripomastigotas que após o rompimento da membrana da célula, são liberadas para a corrente sanguínea e sistema linfático. Essas formas passam a ser denominadas tripomastigotas sanguícolas, sendo responsáveis pelo próximo ciclo de infecção de novas células em diferentes tecidos (Argolo et al., 2008; Rey, 2008; Coura & Dias, 2009).

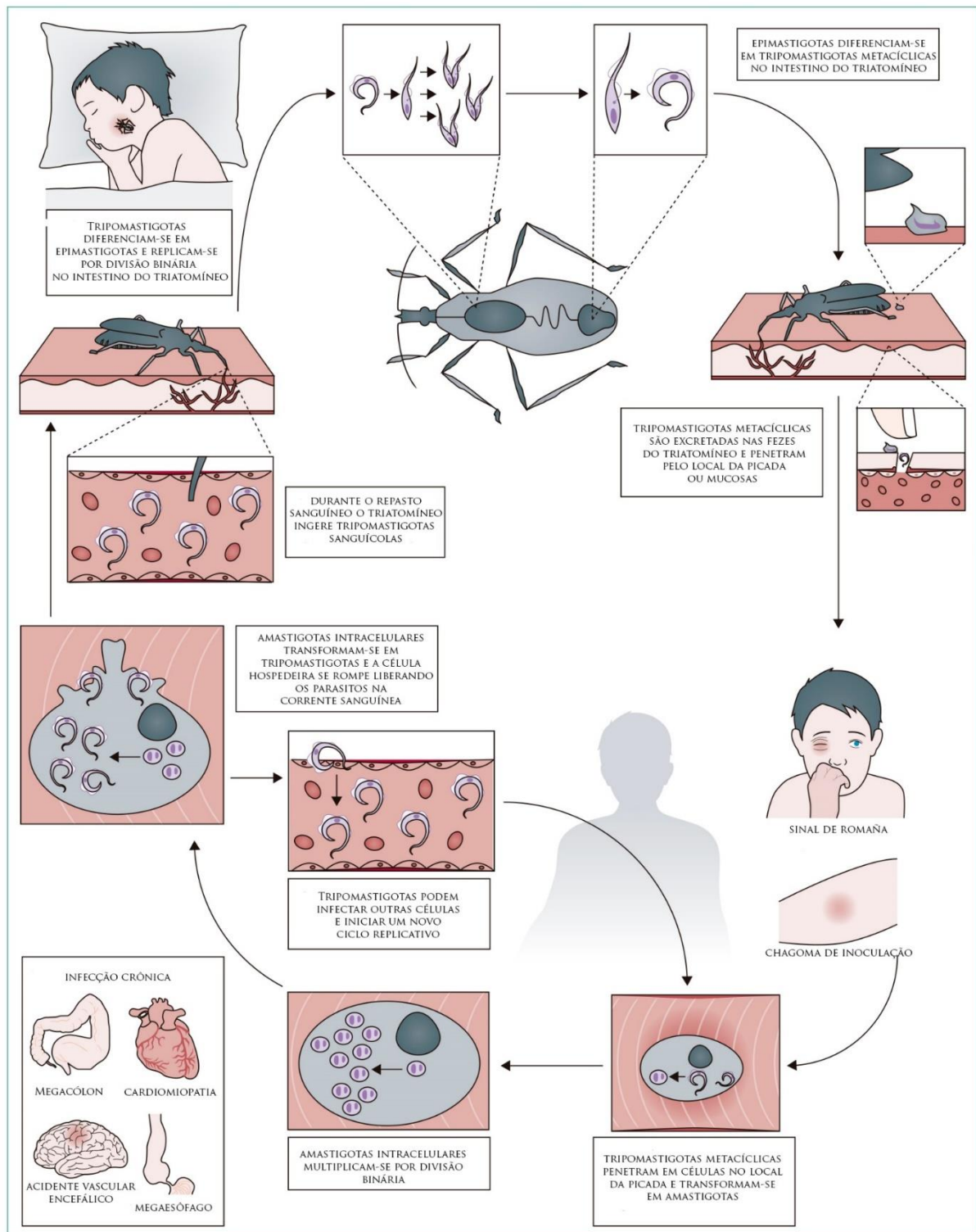


Figura 1.2- Ciclo biológico do *T. cruzi* adaptado de Pérez-Molina & Molina, 2017. O ciclo biológico do *T. cruzi* inicia-se durante o respasto sanguíneo onde o triatomíneo ingere tripomastigostas sanguícolas. Posteriormente, tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas e replicam-se por divisão binária no intestino do triatomíneo. Em seguida, epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas

metacíclicas no intestino do triatomíneo, sendo excretadas nas fezes dos mesmos e penetram pelo local da picada ou mucosas, podendo manifestar sinais como chagoma de inoculação e sinal de romaña. Tripomastigotas metacíclicas penetram em células no local da picada e transformam-se em amastigotas, que multiplicam-se por divisão binária. Logo após, amastigotas intracelulares transformam-se em tripomastigotas e a células hospedeira se rompe liberando os parasitos na corrente sanguínea, que podem infectar outras células e iniciar um novo ciclo replicativo ou serem ingeridas durante um novo repasto sanguíneo pelo triatomíneo.

A transmissão do *T. cruzi* também pode ocorrer através do recebimento de sangue e derivados (Moncayo, 1999, 2003; WHO, 2018), por transmissão congênita (Prata, 2001; WHO, 2017; Torrico, 2015), transplante de órgãos (Favaloro et al., 2015) ou por via oral (Alarcón, 2010; Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012; Filigheddu et al., 2017). Há ainda algumas formas menos comuns, mas que não podem ser descartadas, às que envolvem os acidentes de laboratório (Coura & Castro, 2003; Dias, 2005), manejo e ingestão de carne crua de animais de caça infectados (Coura & Castro, 2003; Dias & Macedo, 2005), transmissão sexual e aleitamento materno (Coura, 2015; Araújo et al., 2017).

Tanto a transmissão transfusional quanto a vetorial do *T. cruzi* vêm diminuindo progressivamente devido a um maior rigor nos bancos de sangue e campanhas organizadas para o controle do vetor triatomíneo, como as que ocorreram nos países do Cone Sul, do Pacto Andino e da América Central. Contudo, ainda se observa infecção por estas vias, seja por falta de controle adequado dos bancos de sangue, seja pela variedade de triatomíneos envolvidos na transmissão. Desta forma, a doença de chagas ainda merece atenção por parte dos pesquisadores, uma vez que milhares de pessoas permanecem infectadas e novos casos ainda vêm sendo registrados (Coura & Castro, 2003; Dias et al., 2016; Tovar Acero et al., 2017). Hoje, no Brasil, os casos crônicos da doença são predominantes, entretanto, nos últimos anos, o perfil epidemiológico da doença adquiriu um novo cenário devido a ocorrência de doença de Chagas aguda (DCA) nos estados da Amazônia Legal, principalmente por transmissão oral, relacionados a ingestão de alimentos, mas também por transmissão vetorial (sem colonização e extradomiciliar). Surtos foram relacionados à transmissão oral em áreas rurais e Peri urbanas da América Latina. Os surtos no Brasil envolveram alimentos como suco da cana-de-

açúcar, contaminados com triatomíneos infectados, suas fezes ou secreções infectadas das glândulas anais de marsupiais; açaí ou bacaba, contaminada por triatomíneos. Colômbia e Venezuela também registraram surtos relacionados a alimentos como sucos de goiaba, laranja ou tangerina, que provavelmente foram contaminados por triatomíneos (Shikanai-Yasuda & Barbosa, 2012). No Brasil, o primeiro surto oficialmente investigado de doença de Chagas aguda relacionado à transmissão oral foi registrado em Santa Catarina em 2005, sendo associado à ingestão de caldo-de-cana contaminado com *T. cruzi*. Este evento repercutiu positivamente na sensibilidade da vigilância (Ministério da saúde, 2015).

A via oral vem se mostrando eficiente na transmissão do *T. cruzi*, uma vez que até mesmo triatomíneos que não eram considerados vetores em potencial estão sendo incluídos (De Noya & González, 2015). Vários casos da doença de Chagas estão associados com a transmissão oral no Brasil, Colômbia e Venezuela (Filigheddu et al., 2017). De 2000 a 2013, foram notificados, no Brasil, 1.570 casos de doença de Chagas aguda, com 91,1% destes casos na região Norte, sendo o estado do Pará o responsável por 82% dos casos, seguido pelas regiões Nordeste (4,7%), Sul (1,8%), Centro-Oeste (1,7%) e Sudeste (0,8%). Neste período 68,9% dos casos registrados ocorreram por transmissão oral (Ministério da Saúde, 2015).

1.5 Patogenia da doença de Chagas e persistência do *T. cruzi* nos tecidos.

O curso clínico da doença de Chagas geralmente compreende uma fase aguda, que ocorre durante as primeiras semanas após a infecção, sendo assintomática na maioria dos casos, porém quando presentes, os sinais e sintomas incluem febre, reação inflamatória local (Chagoma de inoculação ou sinal de Romana), mal-estar, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Essa fase permanece por quatro a oito semanas, e a parasitemia decai substancialmente a partir do 90º dia após a infecção (Laranja et al., 1956; Wegner & Rohwedder, 1972; Coura & Borges-Pereira, 2012). A fase aguda geralmente se resolve espontaneamente e somente 1 a 5% dos pacientes desenvolvem a doença aguda severa, que inclui miocardite, efusão pericárdica e meningoencefalite, com risco de morte em 0,2 a 0,5% dos casos (Laranja et al. 1956; Pinto et al., 2008). Quadros agudos originários

de infecção congênita pelo *T. cruzi* ocorre em 5% das crianças nascidas de mães cronicamente infectadas (Carlier et al., 2015).

À medida em que a infecção progride, o paciente entra na chamada fase crônica da doença. A maioria das pessoas não apresenta sintomas ou envolvimento visceral. Esta forma clínica da doença denominada forma indeterminada, tem bom prognóstico e se caracteriza por apresentar soropositividade para o *T. cruzi*, sem que haja sinais clínicos ou sintomas da doença (Dias, 1989). Contudo, à medida em que os métodos de diagnóstico tornam-se mais sensíveis, um maior número de pacientes com esta forma da doença é diagnosticado com alterações cardíacas ou digestivas sutis (Viotti et al., 2004; Pérez-Ayala et al., 2011).

Dados da década de 1980 mostraram que, em geral, 30 a 40% dos pacientes na fase crônica podem apresentar comprometimento cardíaco e/ou gástrico, 10 a 30 anos após a infecção aguda (Bittencourt et al., 1975; Coura et al., 1985; Espinosa et al., 1985). O envolvimento mais grave e mais frequente é o cardíaco e ocorre entre 14 e 45% de pacientes infectados crônicos (Coura et al., 1985; Dias, 1989; WHO, 2002; Viotti et al., 2006; Pérez-Ayala et al., 2011; Salvador et al., 2014). As lesões afetam principalmente o sistema de condução do órgão e o miocárdio (Rassi & Little, 2000). A principal causa de óbito em pacientes com comprometimento cardíaco é a morte súbita, seguida de insuficiência cardíaca refratária. (Rassi et al., 2001; Nunes et al., 2018). A doença de Chagas também é uma das principais causas do AVC cardioembólico, sendo duas vezes mais comum na doença cardíaca causada pela doença de Chagas que em outras formas de cardiomiopatia (Nunes et al., 2009; Cardoso et al., 2014).

O envolvimento gastrointestinal é menos comum, ocorrendo em 10 a 21% dos pacientes crônicos, mais frequentemente em países do Cone Sul da América do Sul (Coura et al., 1985; De Oliveira et al., 1998; Pérez-Ayala et al., 2011; Salvador et al., 2014). As manifestações variam de distúrbios de motilidade assintomática, acalasia leve, à megaesôfago grave. Outro distúrbio é o megacólon, caracterizado por constipação persistente que pode levar a fecaloma e isquemia intestinal (De Oliveira et al., 1998). Envolvimento cardíaco e gastrointestinal raramente acontecem concomitantemente

Duas hipóteses principais explicam os mecanismos da patogênese da doença de Chagas humana. Uma defende que a persistência do parasito no hospedeiro é

uma das principais causas de patologia e a outra diz que existe uma resposta imunológica contra antígenos próprios que é responsável pelos danos teciduais observados (Hyland & Engman, 2006; Kierszenbaum, 2007; Dutra & Gollob, 2008; Teixeira et al., 2011).

Durante a fase aguda da infecção, ocorre a invasão ativa e replicação intracelular do parasito em diferentes tecidos do hospedeiro. A resposta imunológica consegue controlar, mas não exterminar a carga parasitária tecidual e, assim, o parasito persiste por décadas nos tecidos dos hospedeiros, na maioria das vezes sob forma de infecção assintomática. Pouco se sabe sobre o ciclo de infecção dos parasitos persistentes. A detecção de níveis muito baixos de parasitos circulantes em uma fração significativa de indivíduos cronicamente infectados (Gutierrez et al., 2008) sugere que o ciclo intracelular do parasito está ativo, ao menos intermitentemente, constituindo a base para o tratamento etiológico na forma indeterminada. Desta forma, o objetivo do tratamento é prevenir ou melhorar as manifestações da infecção crônica pela redução ou eliminação do número de parasitos.

A persistência crônica do *T. cruzi* nos tecidos tem sido associada à perpetuação da doença. O parasito é frequentemente encontrado nas células musculares cardíacas e lisas em animais e humanos cronicamente infectados (Viotti et al., 2006). Além disso, por técnicas moleculares, DNA do parasito pode ser detectado na circulação sanguínea (Gutierrez et al., 2008). Outro fato que constitui evidência da persistência são os casos de reativação da parasitemia em pacientes imunossuprimidos (Diazgranados et al., 2009; Ferreira et al., 2011), os casos de transmissão vertical na fase crônica em áreas endêmicas da América Latina (Gascon et al., 2010), além da transmissão após recebimento de órgãos, sangue e/ou derivados de doadores chagásicos crônicos, em áreas não endêmicas (Castro, 2009; Angheben et al., 2015).

Nos casos de forma indeterminada da fase crônica não há uma explicação de alguns indivíduos permanecerem assintomáticos e outros progredirem para a forma sintomática cardíaca ou digestiva. O consenso é que, a resposta imunológica e/ou a resposta autoimune estão associadas à sintomatologia, mas não explicam totalmente a progressão para a doença (Nagajyothi et al., 2012). Acredita-se que o parasito possa sobreviver oculto em sítios de armazenamento, como o tecido

adiposo (Shoemaker et al., 1970; Combs et al., 2005, Ferreira et al., 2011), e criar um estado inflamatório crônico discreto, como o observado na obesidade mórbida (Ferrante, 2007; Nagajyothi et al., 2011).

1.6 Tratamento

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), o custo mundial com o tratamento de pacientes chagásicos atinge US\$ 7 bilhões/ano (WHO, 2017), mas menos de 1% dos indivíduos infectados têm acesso ao diagnóstico e ao tratamento sistemático, o que contribui para um elevado impacto na morbimortalidade da doença e manutenção do seu elevado custo social (Dias et al., 2016; Chatelain, 2017; Molyneux et al., 2017).

A produção de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas, com maior eficácia e menos efeitos colaterais não ocorre há algum tempo. Apenas duas drogas, benzonidazol e o nifurtimox são utilizados para o tratamento da doença de Chagas. Apesar desses nitroderivados terem relevante toxicidade e sua utilização apresentar resultados obtidos insatisfatórios. (Teixeira, 2007; Siriano, 2013).

O nifurtimox foi retirado do mercado em decorrência dos efeitos colaterais apresentados pelos pacientes (Rassi et al., 2001) e, desde a década de 1980, teve sua comercialização interrompida, primeiramente no Brasil, e depois em vários países da América do Sul (Coura e Castro, 2003). O benzonidazol é considerado o tratamento de primeira linha, uma vez que apresenta efeitos colaterais mais brandos e uma melhor eficácia quando comparado com o nifurtimox (Bern, 2015).

O tratamento é mais eficaz quando acontece na fase aguda da doença (De Andrade et al., 1996; Sosa Estani et al., 1998; Chippaux et al., 2013; Molina et al., 2014), entretanto, como poucos indivíduos são diagnosticados nesta fase da doença, o tratamento torna-se limitado. Na fase aguda, o percentual de cura pode chegar a 100%. Na fase crônica, entretanto, este percentual varia de 20 a 60% (Rassi et al. 2010).

Um estudo denominado Avaliação do Benzonidazol para a Triagem de Tripanossomíase (BENEFIT) foi projetado para avaliar a segurança e a eficácia desta droga em pacientes com cardiomiopatia chagásica (Morilo et al., 2015). O objetivo do estudo era determinar se os 1,17 milhões de pessoas que apresentam

cardiomiopatia chagásica (WHO, 2015) apresentariam melhora clínica ou mesmo cura com este tratamento. Os resultados mostraram que 20% a 30% dos indivíduos tratados evoluíram para cardiomiopatia chagásica, que é uma condição cardíaca debilitante associada a distúrbios de condução, insuficiência cardíaca e morte súbita, mostrando que, o tratamento com benzonidazol não resultou em nenhuma melhoria estatisticamente significativa nos resultados clínicos cardíacos, quando comparado com pacientes tratados com placebo (Pecoul et al., 2016). A aplicação de todo o volume de conhecimento gerado com as pesquisas envolvendo a doença de Chagas e *T. cruzi*, assim como em outras doenças negligenciadas, não são revertidos para o desenvolvimento de novos fármacos efetivos, por falta de interesse das companhias farmacêuticas e falhas nas políticas públicas envolvidas na produção e desenvolvimento de medicamentos (Teixeira, 2007; Siriano, 2013).

Os objetivos do tratamento da doença de Chagas são: curar a infecção em algumas situações, diminuir a parasitemia e a possibilidade de transmissão da doença e prevenir lesões nos órgãos ou a evolução das mesmas. Devem ser realizadas intervenções como o tratamento antiparasitário, e paralelamente o tratamento dos sinais e sintomas cardíacos e digestivos. É indicado a maioria dos pacientes, excluindo pacientes com cardiopatia avançada, grávidas ou mulheres amamentando, pacientes com hepatopatia crônica e insuficiência renal crônica, megaesôfago de grau avançado; megacólon avançado e supressão da medula óssea, incluindo leucopenia, granulocitopenia e / ou trombocitopenia (Carvalho et al., 2015).

Algumas abordagens têm sido empregadas no desenvolvimento de fármacos para doenças negligenciadas atualmente, o reposicionamento e a combinação. Novos usos para medicamentos já conhecidos são uma abordagem excelente, uma vez que os perfis de segurança e farmacocinéticas já foram otimizados para uso humano e questões ligadas à manufatura e armazenamento já foram avaliados (Kaiser et al., 2015). O reposicionamento corresponde a 30% de produtos como medicamentos e vacinas aprovadas pelo FDA (Jin & Wong, 2014). Combinação entre medicamentos permite a redução de doses e de tempo de tratamento, além de reduzir efeitos colaterais e desenvolvimento de resistência nos parasitos. Estudos in vivo utilizando modelos de infecção murina aguda demonstraram que a combinação de fármacos ou de candidatos, mesmo se não levar a uma cura parasitológica, pode

reduzir a carga parasitária, taxa de mortalidade e lesões teciduais (Maldonado et al., 1993; Urbina et al., 1993a).

1.7 O processo fibrótico na doença de Chagas

A persistência do parasito está diretamente relacionada à morte celular e às respostas imunológicas a ele direcionadas, que desempenha papel central no desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) (Tarleton, 2003; Kierszenbaum, 2007; Bonney & Engman, 2008; Fernandes et al., 2012). A CCC caracteriza-se pela presença de infiltrado inflamatório esparso, parasitemia mínima, discreto parasitismo tecidual e extensa fibrose reativa e reparativa (Rossi, 1991; Rassi et al., 2017).

A fibrose cardíaca está presente em muitos processos patológicos, incluindo hipertensão, doença coronariana e insuficiência cardíaca (Swynghedauw, 1999). A fibrose do miocárdio tem efeitos adversos na função cardíaca, culminando na crescente rigidez do coração, o que prejudica a função diastólica, e também em arritmias (Lin et al., 2016). A fibrose cardíaca é caracterizada pela deposição excessiva de matriz extracelular, sendo considerada resultado da atividade exagerada de fibroblastos. Inicialmente, acreditava-se que esse depósito era originado por fibroblastos residentes, porém outros estudos sugerem que outras células podem estar envolvidas neste processo, como células endoteliais (sofrendo transição de endoteliais para mesenquimais) (Zeisberg et al., 2007), células-tronco mesenquimais (diferenciando-se em fibroblastos) (Ngo et al., 2014) e fibrócitos circulantes.

1.8 Fibrócitos

Os fibrócitos circulantes, que são derivados de células hematopoiéticas, foram primeiramente descritos, em 1994, como uma subpopulação de leucócitos e podem ser definidos como células derivadas de monócitos que apresentam as características inflamatórias dos macrófagos e as propriedades de remodelamento tecidual dos fibroblastos (Bucala et al., 1994; Quan et al., 2004; Reilkoff, Bucala,

Herzog, 2011). Essas células, porém, não podem ser confundidas com os fibrócitos descritos por Junqueira & Carneiro (2001) como fibroblastos quiescentes que são de origem mesenquimais.

Tem sido extensamente descrito na literatura que fibrócitos circulantes, produtores de matriz extracelular, podem contribuir para o desenvolvimento de fibrose pulmonar, renal (King et al., 2011; Reich et al., 2013) e cardíaca. Estas células estão significativamente aumentadas no coração de indivíduos acometidos com isquemia cardíaca (Mölmann et al., 2006), hipertensão (Fang et al., 2013), insuficiência cardíaca (Chu et al., 2010) e fibrilação atrial (Xie et al., 2014), o que nos leva a pensar que podem estar presentes também nas lesões fibróticas da CCC (Lin et al., 2016).

Os fibrócitos também desempenham um importante papel nos processos inflamatórios e na fase proliferativa da cicatrização. Por serem células produtoras de colágeno, eles produzem diversas proteínas da matriz extracelular e têm a capacidade de migrar precocemente e se acumular nos tecidos lesionados (Reilkoff, Bucala, Herzog, 2011).

Bucala e colaboradores, em 1994, descreveram essas células quando estudavam um modelo de cura de lesões. Neste estudo os autores implantaram uma esponja de polivinil-álcool no tecido subcutâneo de camundongos com o objetivo de observar as principais células envolvidas no processo de reparo tecidual. Mostraram um rápido influxo de células do sangue periférico, entre elas: neutrófilos, monócitos e linfócitos. Além destas, foi observado um influxo de células fusiformes, semelhantes à fibroblastos. A presença destas células coincidiu com a entrada de células inflamatórias pela circulação, sugerindo que essas pudessem ter origem no sangue periférico. Após cultivo das células sanguíneas, confirmou-se a existência de um tipo celular semelhante aos fibroblastos, produtor de proteínas de matriz extracelular, mas que apresentava os marcadores de leucócitos (CD45) e de células progenitoras (CD34). Esta nova subpopulação celular recebeu o nome de “fibrócito”, a partir da combinação entre o radical grego “kitos”, que significa célula, e o radical “fibro”, denotação do latim que significa fibra (Bucala et al., 1994; revisto por Quan et al., 2004).

Embora a identificação dos fibrócitos tenha ocorrido, inicialmente, em 1994 por Bucala, sua origem só foi definida em 2001 por Abe e colaboradores, que

demonstraram que estes podem ser originados a partir de uma subpopulação de monócitos, conhecida como CD14+ em humanos e Ly6C+/Gr1+/ CD115+/CD11b+ em camundongos (Abe et al., 2001).

Ao longo dos anos, novos estudos ampliaram o conhecimento sobre os fibrócitos, tanto em relação aos marcadores quanto às suas funções. Inicialmente utilizava-se como critério mínimo para identificação dos fibrócitos em culturas ou em cortes de tecidos, a produção de colágeno e a expressão de CD34 e ou CD45. No entanto, esse conceito não é suficiente pois, em alguns casos, pode haver a sobreposição da expressão destes marcadores entre fibrócitos, macrófagos e fibroblastos (Fig. 1.3). Sendo assim, avaliações adicionais incluindo outros marcadores celulares, análise morfológica e a produção de proteínas da matriz extracelular se fazem necessárias para melhor identificação dos fibrócitos em seu contexto biológico (Quan et al., 2004; Pilling et al., 2006; Suga et al., 2014).

Herzog & Bucala (2010) verificaram que a identificação de fibrócitos do sangue periférico pode ser feita através da coexpressão de colágeno e CD45 e/ou CD34. Entretanto, durante a classificação de fibrócitos, pode haver uma sobreposição na expressão desses marcadores, o que levaria a um erro nessa classificação. Nesse contexto, uma avaliação morfológica torna-se necessária, uma vez que tanto os macrófagos quanto os fibrócitos, in vitro ou in vivo, expressam marcadores inflamatórios semelhantes; além disso, os fibrócitos aderentes apresentam morfologia em forma de fuso, distinguindo-se dos macrófagos, que são mais esféricos (Pilling et al., 2009). Do mesmo modo, os fibroblastos não expressam os marcadores inflamatórios e hematopoiéticos, como os fibrócitos, apesar de também apresentarem forma de fuso (Reilkoff, Bucala, Herzog, 2011).

Ainda não é clara a função dos fibrócitos do sangue periférico em outros tecidos em condições normais e de patologias provocadas por agentes infecciosos, apesar do crescente número de relatos que descrevem as contribuições destas células no processo inflamatório em diversas doenças (Chesney et al., 1998, Quan et al., 2004, Wang et al., 2007, Reilkoff, Bucala, Herzog, 2011; Peng & Herzog, 2012). Os fibrócitos estão associados com a cicatrização de feridas e com processos fibróticos (Chesney et al., 1997; Abe et al., 2001; Moore et al., 2005; Ishida et al., 2007), além de estarem envolvidos nos processos de inflamação e remodelação

iniciais (Nihlberg et al., 2006) e nas interações hospedeiras com microrganismos (Grab et al., 1999).

Estudos sobre a patogênese da fibrose cardíaca sugerem que o fibrócito circulante pode ser um alvo potencial para o tratamento de fibrose cardíaca.

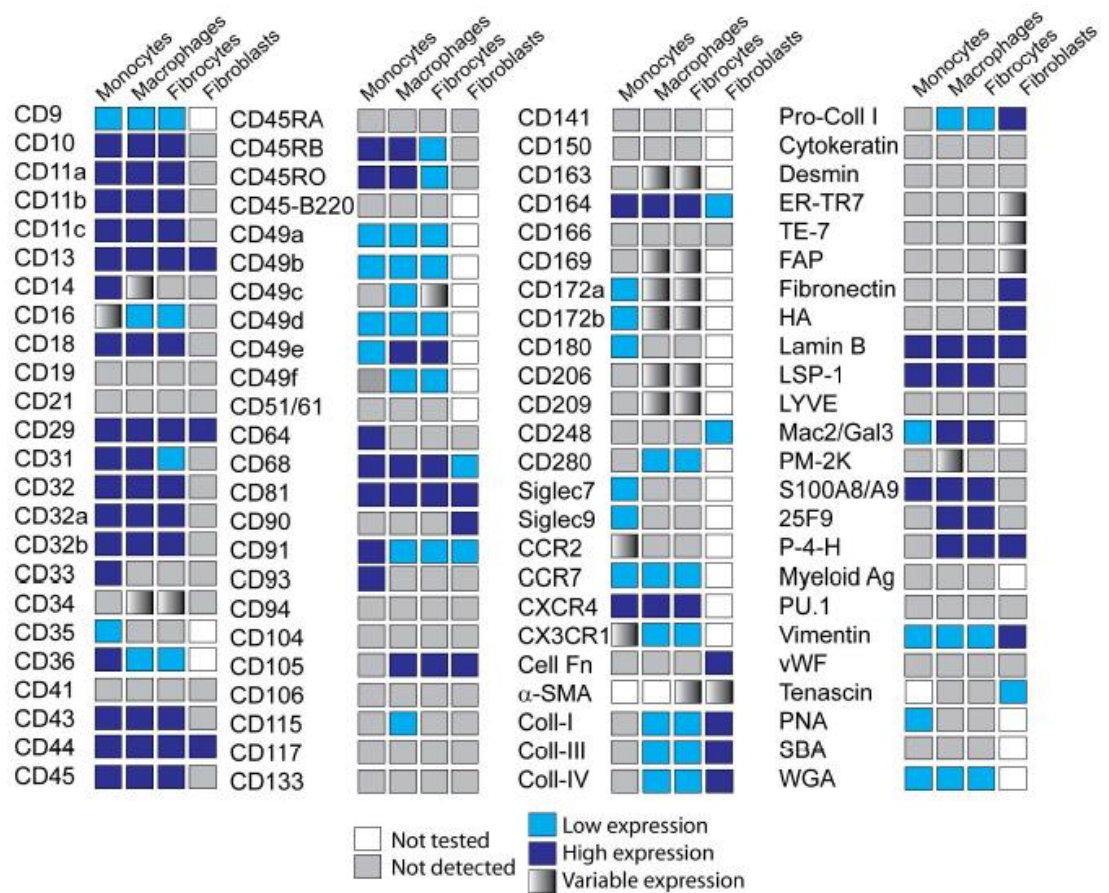


Figura 1.3- Expressão de marcadores de monócitos, macrófagos, fibrócitos e fibroblastos. Combinação de dados de marcadores expressos pelas células analisadas. Reproduzido de Pilling et al., 2009.

2 JUSTIFICATIVA

Os fibrócitos são células presentes em vários tecidos, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (Bucala et al., 1994). São importantes no processo cicatricial por contribuírem no mecanismo de formação do granuloma, na atividade antigênica, na produção de colágeno e na matriz proteica, participação na remodelagem e na inflamação como fonte rica de citocinas (Abe et al., 2001; Quan et al., 2004), na produção de fatores de crescimento, na produção de fatores angiogênicos, na contribuição na formação de novos vasos sanguíneos e em algumas doenças fibróticas (Metz, 2002; Quan et al., 2004). Os fibrócitos têm as características inflamatórias de macrófagos e as propriedades de remodelamento tecidual dos fibroblastos. Estímulos inflamatórios crônicos medeiam a diferenciação, migração e o acúmulo destas células, em condições fibrosantes, associadas à autoimunidade, doenças cardiovasculares e asma. Embora os fibrócitos constituam apenas uma pequena fração dos leucócitos circulantes em humanos normais, são células importantes envolvidas na progressão de muitas doenças, pois números aumentados destas células estão presentes em patologias humanas caracterizadas por processos inflamatórios crônicos estimulados por macrófagos e ativação persistente de fibroblastos. Estas doenças incluem, por exemplo, doenças pulmonares e de via aéreas, fibrose sistêmica nefrogênica, e doenças cardiovasculares e autoimunes, como a doença de Chagas. No entanto, estudos sobre as interações de fibrócitos com os parasitos envolvidos nessa infecção são escassos. Sendo assim, o presente estudo investigou a possibilidade de infecção de fibrócitos derivados de sangue periférico de camundongos por um isolado de *T. cruzi*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Estabelecer um procedimento de obtenção e cultivo de fibrócitos murinos que permitisse estudá-lo na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer uma cultura de fibrócitos murinos;
- Caracterizar as células como fibrócitos;
- Testar a infecção de fibrócitos pelo *Trypanosoma cruzi*.
- Avaliar a produção de NO

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos Swiss Webster (SW) obtidos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz) e mantidos no biotério de experimentação do Pavilhão Hélio Peggy Pereira, sob temperatura controlada, com ração apropriada e água filtrada *ad libitum*. Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram submetidos, avaliados e aprovados pela Comissão de Ética para uso de Animais de Laboratório do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA/IOC), sob licença de número: L-008/2017.

4.2 Padronização dos protocolos

Os protocolos para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês Peripheral Blood Mononuclear Cell) de camundongos, diferenciação e cultivo de fibrócitos existentes na literatura científica apresentam algumas variações. Desta forma, antes da definição da metodologia a ser seguida houve a necessidade da realização de alguns experimentos de padronização descritos a seguir.

4.2.1 Rendimento celular

A fim de testar o rendimento celular na obtenção de PBMCs, foram utilizados na coleta de sangue os anticoagulantes EDTA (do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid - Sigma-Aldrich®) ou salina citratada. Após eutanásia dos animais com 300mg/kg de cloridrato de quetamina e 30mg/kg de cloridrato de xilazina, foi coletado 1 mL de sangue de quatro camundongos Swiss Webster por punção cardíaca. Foram utilizados o EDTA na coleta do sangue de dois animais e salina citratada na coleta dos outros dois animais. Posteriormente, todas as amostras foram processadas para obtenção de PBMCs e os resultados comparados.

4.2.2 Obtenção de PBMCs

Para definir a melhor forma de obtenção de PBMCs por centrifugação com gradiente de densidade Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich®), foram realizados dois protocolos. No primeiro protocolo, o sangue foi diluído na proporção 1:1 em PBS (Phosphate Buffered Saline) ou em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - Sigma-Aldrich®) sem SFB (Soro Fetal Bovino), adicionado sobre o Histopaque®-1077 e centrifugado a 390 g por 40 minutos a 20°C (Universal 320R, Hettich®). No segundo protocolo, foi realizada a diluição de 1:4 do sangue em PBS ou em meio DMEM sem SFB, adicionado sobre o gradiente Histopaque®-1077 e centrifugado a 540 g a 20°C por 20 minutos.

4.2.3 Meio de cultura e concentração de SFB

A fim de adequar o meio de cultura e a concentração de SFB para o cultivo e diferenciação dos fibrócitos, foram testados os meios DMEM e DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham - Sigma-Aldrich®) sem SFB, com 10% e 20% de SFB (Gibco®).

4.2.4 Concentração de PBMCs

Com o propósito de ajustar a concentração de PBMCs necessária para uma cultura de fibrócitos, as PBMCs foram cultivadas em placas de 6 e 24 poços e em lâminas Nunc™ Lab-Tek™ (Thermo Scientific™) de vidro com 8 poços. Foram testadas diferentes concentrações de células em cultura: 1×10^6 , 2×10^6 , $2,5 \times 10^6$, e 1×10^7 células por poço.

4.2.5 Remoção de plaquetas

Para remoção das plaquetas sanguíneas, as quais aderem às lamínulas e células prejudicando o crescimento e diferenciação dos fibrócitos, foram testados três métodos de lavagem das PBMCs. No primeiro método, as células foram lavadas três vezes, sendo a primeira lavagem realizada com PBS e centrifugação de 1000 g por 15 minutos a 4°C; a segunda lavagem realizada também com PBS, porém com centrifugação de 740 g por 15 minutos a 4°C, e a terceira lavagem realizada com meio DMEM/F-12 sem SFB e centrifugação de 390 g por 15 minutos a 4°C. No segundo método foram realizadas três lavagens com PBS e centrifugação de 380 g

por 10 minutos a 4 °C. No terceiro método foram realizadas quatro lavagens com meio DMEM sem SFB, sendo três centrifugações de 380 g a 4 °C por 5 minutos e uma última a 200 g a 4 °C por 10 minutos.

Em todos os testes as células foram quantificadas em câmara de Neubauer antes e após as lavagens, para verificação da perda celular, utilizando o corante vital Azul de Tripán (Sigma-Aldrich®).

4.3 Obtenção e cultura de fibrócitos

A obtenção de fibrócitos a partir de PBMCs foi realizada com base nos parâmetros definidos com os protocolos de padronização, acima descritos. Para isso, camundongos Swiss Webster foram eutanasiados com 300mg/kg de cloridrato de quetamina e 30mg/kg de cloridrato de xilazina e sangrados por punção cardíaca, utilizando solução anticoagulante de EDTA 2%. Três mL de sangue foram diluídos 1:4 em meio DMEM sem SFB. Esta suspensão foi adicionada lentamente sobre 3 mL de Histopaque®-1077, o qual foi centrifugado a 540 g por 20 minutos a 20 °C, sem freio e aceleração 4.

Após a centrifugação o anel formado contendo as PBMCs foi retirado cuidadosamente e mantido em gelo. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com meio DMEM sem SFB e centrifugadas a 380 g por 5 minutos a 4 °C. Na presença de hemácias após as três lavagens, o pellet foi ressuspensão em 2 mL de tampão de lise ACK (*Ammonium Chloride Potassium*), incubado de 3 a 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugado a 380 g por 5 minutos a 4 °C em meio DMEM com 10% de SFB. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensão em meio DMEM sem SFB e realizada a última lavagem com centrifugação a 200 g por 10 minutos a 4 °C para a retirada das plaquetas. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 2 mL de meio DMEM/F-12 sem soro e quantificadas em câmara de Neubauer com o auxílio do corante vital Azul de Tripán. As células foram distribuídas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro de 13 mm, na concentração de 2×10^6 células por poço e incubadas com meio DMEM/F-12 sem SFB em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ (Panasonic Healthcare Co., Ltda. MCO-19AICUV-PA). Após 48h as culturas foram lavadas com PBS para a remoção das células não aderentes. As culturas

foram mantidas sob estas condições durante 21 dias, com troca do meio a cada cinco dias para purificação da cultura.

4.4 Imunofluorescência

A imunofluorescência foi realizada a fim de confirmar a presença de fibrócitos diferenciados após 21 dias de cultivo, em placa de 24 poços, antes da realização da cinética de infecção.

Para isto, fibrócitos plaqueados em lamínulas foram lavados duas vezes com PBS, fixados com paraformaldeído (PFA) a 4% por 20 minutos em temperatura ambiente e lavados três vezes com PBS gelado. As células foram incubadas por 30 minutos com solução a 0,3% Triton X-100 em PBS, para permeabilização. Posteriormente, foram lavadas 3 vezes com PBS por 10 minutos. A fim de bloquear receptores Fc para IgG (FcγR) as células foram incubadas com 1% BSA e 10% de soro normal de carneiro em PBST (PBS + 0,1% Tween 20) por 30 minutos a temperatura ambiente. As células foram incubadas *over night* a 4 °C com anticorpo primário anti-CD11b, anti-CD45R ou anti-fibronectina ou anti-Colágenos Tipo I ou III ou IV, diluídos em 1% BSA em PBST. Posteriormente, as células foram lavadas 3 vezes com PBS por 10 minutos. As lamínulas foram então incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente, no escuro, com anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugados com FITC (Sigma-Aldrich®) diluídos em 1% de BSA. As lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS por 10 minutos no escuro e incubadas durante 1 minuto com DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich®). Após duas lavagens em PBS por 10 minutos, as lamínulas foram montadas em lâminas com ProLong® Gold e observadas em microscópio confocal de varredura a laser LSM 710 (Zeiss) na Plataforma de microscopia confocal da FIOCRUZ.

4.5 Parasitos

Foram utilizados nos experimentos de infecção formas tripomastigotas da cepa SC2005 de *Trypanosoma cruzi*, derivadas de cultura de células de linhagem VERO (células do epitélio renal de macaco verde africano, *Cercopithecus aethiops*).

Esta cepa de parasito foi isolada do sangue periférico de um indivíduo na fase aguda da doença de Chagas, adquirida por infecção oral durante um surto em Santa Catarina, Brasil, após a ingestão de formas do parasito contidos em caldo de cana-de-açúcar (Da Silva et al., 2006; Steindel et al. 2008).

4.5.1 Cultivo e manutenção dos parasitos

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio de cultura axênico LIT (Liver Infusion Triptose) (Camargo, 1964) e incubadas por 30 dias em estufa B.O.D (MSM-010, MS Mistura) a 28°C, para a ocorrência da metaciclogênese parcial dos parasitos e obtenção dos tripomastigotas metacíclicos.

Para manter a infectividade da cepa, após a metaciclogênese, foram realizadas passagens sucessivas em camundongos Swiss Webster machos. Para isto, os camundongos foram inoculados por via intraperitoneal com 1×10^6 parasitos por animal. No 11º dia após a infecção, no pico parasitêmico, os animais foram eutanasiados com 300mg/kg de cloridrato de quetamina e 30mg/kg de cloridrato de xilazina e posteriormente sangrados por punção cardíaca. Para obtenção do sangue total, foi utilizada uma seringa de 1mL contendo o anticoagulante EDTA, e agulha hipodérmica calibre 13x4,5 mm. O sangue contendo os parasitos foi semeado em meio LIT, de forma asséptica, e mantido em estufa B.O.D (MSM-010, MS Mistura) a 28°C.

4.5.2 Obtenção de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* derivadas de cultura de células (TCC)

Para obtenção do número necessário de parasitos para a infecção dos fibrócitos, células Vero foram cultivadas em garrafas de poliestireno com meio DMEM suplementado com 5% de SFB, e incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂.

Posteriormente à metaciclogênese dos parasitos, as células Vero foram infectadas com essas formas, na proporção de 10 parasitos por célula e incubadas a 34 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Após 5 dias de infecção, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos e reservados. As células foram lavadas por três vezes com PBS para total remoção dos parasitos livres. O sobrenadante e o PBS usado na lavagem das células foram transferidos para tubos cônicos de 50 mL e centrifugados

a 1520 x g por 10 minutos a 4 °C. Ao final do procedimento, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em meio DMEM/F-12 sem SFB. Os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer e a concentração de parasitos ajustada para a infecção dos fibrócitos murinos.

4.6 Infecção dos fibrócitos murinos

Após 21 dias de cultivo, os fibrócitos foram infectados com tripomastigotas (TCC), utilizando uma proporção de 10 parasitos por célula (10:1) em meio DMEM/F12 sem SFB. As culturas foram mantidas em estufa a 34 °C com atmosfera de 5% de CO₂.

A cinética de infecção foi determinada em 2h, 4h, 6h, 12h, 24h, 48h e 72h após a infecção. As lamínulas foram recolhidas em cada tempo e lavadas 2 vezes em PBS, fixadas em BOUIN por 5 minutos, lavadas 3 vezes com álcool 70% por 30 minutos cada, e então lavadas com água destilada. Em seguida, foram coradas com solução de Giemsa (solução de azur-eosina-azul de metileno, segundo Giemsa, Merck, solução a 10% filtrada em papel de filtro) por 20 minutos (preparada antes da utilização), depois lavadas com água destilada e desidratadas da seguinte forma: dois banhos de acetona 100%, um banho de 70% de acetona + 30% de xilol; um banho de 50% de acetona + 50% de xilol; um banho de 70% de acetona + 30% de xilol e dois banhos de xilol 100%. As lamínulas foram montadas sobre lâminas com Entellan® (Merck).

A carga parasitária intracelular foi determinada por observação e contagem através de microscopia de luz (objetiva de 63x, ApoTome Zeiss®) em quatro lamínulas por tempo de infecção. Em cada lamínula foram contadas 100 células, registrando-se o número de células infectadas e a quantidade de parasitos por célula. A porcentagem de infecção foi determinada pelo número total de células infectadas e a média do número de parasitos por célula foi calculada pela soma total das amastigotas intracelular dividido pela porcentagem de células infectadas.

4.7 Dosagem de óxido nítrico (NO)

Para avaliar a produção de NO em culturas primárias de fibrócitos infectados, incubaram-se 100 µL de sobrenadante de células infectadas e não infectadas (controle) com 100 µL de reagente de Griess [0,1% de dicloridrato de N- (1-naftil) etilenodiamina (Sigma-Aldrich®), 1% sulfanilamida (Sigma-Aldrich®) e ácido fosfórico a 5% (Sigma-Aldrich®)] em placas de 96 poços de fundo chato à temperatura ambiente. As leituras foram realizadas após 10 minutos de incubação a 550 nm em um leitor de microplacas (Biochrom EZ Read 400). A concentração de NO foi determinada a partir da comparação com a curva padrão, obtida com 1-10 µM de nitrito de sódio (Sigma-Aldrich®) (Green et al., 1982). Todas as medições foram realizadas em quadruplicata.

4.8 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em quadruplicata e todos os dados apresentados foram obtidos através do cálculo da média e desvio padrão dos valores brutos.

A significância estatística foi calculada com o teste ANOVA (One Way Análise de Variância) para as análises de porcentagem de fibrócitos infectados, média de amastigotas intracelular e para o índice de infecção. O teste 2way ANOVA foi utilizado para análise dos dados da dosagem de óxido nítrico (NO). Em todos os testes um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Toda a análise estatística foi realizada com o auxílio do software Graph Pad Prisma 6.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização dos Protocolos

5.1.1 *Rendimento celular*

Os primeiros ensaios foram realizados para determinar o melhor anticoagulante a ser utilizado nos experimentos, já que a literatura descreve uma variação dependente do anticoagulante. Nossos resultados mostraram que quando se utilizou o EDTA o rendimento na obtenção de PBMCs foi maior ($4,7 \times 10^6$ células/mL) que o obtido com salina citratada ($3,4 \times 10^6$ células/mL). Além disso a observou-se mais fibrócitos quando se utilizou EDTA do que quando se utilizou salina citratada.

5.1.2 *Obtenção de PBMCs*

A centrifugação em gradiente de densidade Histopaque®-1077 é um fator crítico na obtenção de PBMCs. Comparando os dois métodos testados, observou-se que a diluição do sangue 4 vezes em PBS ou em meio DMEM sem SFB, com centrifugação de 540 g por 20 minutos a 20 °C foi o que permitiu recuperar um maior número de PBMCs ($6,3 \times 10^6$ células/mL). Utilizando-se a diluição de 1:1 obteve-se a concentração de ($5,6 \times 10^6$ células/mL).

5.1.3 *Meio de cultura e concentração de SFB*

O meio de cultura utilizado, assim como a concentração de SFB também são fatores importantes que foram levados em consideração no cultivo dos fibrócitos. A análise por microscopia de luz invertida mostrou que as culturas mantidas com meio DMEM, independente da presença ou ausência de SFB, não se mantiveram viáveis até 21 dias de cultivo, tempo necessário para a diferenciação dos fibrócitos.

Em contrapartida, as células cultivadas com o meio DMEM/F-12 isento de SFB tiveram uma maior diferenciação em fibrócitos do que quando cultivadas com SFB. Quando as células foram cultivadas com SFB, os fibrócitos exibiram extensões citoplasmáticas, vários apresentaram morfologia arredondada e fusiforme. Porém, quando cultivadas em meio isento de SFB, multiplicaram-se e exibiram uma

morfologia alongada, com várias projeções citoplasmáticas. Culturas com essas características mantiveram uma morfologia homogênea e exibiram taxas mais altas de proliferação do que culturas cultivadas em meio contendo SFB após 21 dias.

5.1.4 Concentração de PBMCs

A observação ao microscópio de luz invertida das culturas de PBMCs mostrou que as células que apresentaram melhor diferenciação, estabilidade e confluência celular, após 21 dias de cultivo, foram as plaqueadas em lamínulas de vidro em placa de 24 poços na concentração de 2×10^6 células por poço.

5.1.5 Remoção de plaquetas

Uma das dificuldades encontradas durante os experimentos foi a presença de uma concentração elevada de plaquetas nas culturas, as quais aderiam nas lamínulas e nas células não permitindo o crescimento e diferenciação dessas em fibrócitos. Foram testados 3 métodos de lavagem para a remoção destas plaquetas das culturas, variando-se o diluente, o número de lavagens e a velocidade das centrifugações como descrito no item 4.2.5.

A análise por microscopia de luz invertida mostrou que não obtivemos eficácia na remoção das plaquetas com uma perda expressiva no número de PBMCs nos dois primeiros métodos testados. Entretanto, o terceiro método, no qual realizou-se quatro lavagens com meio DMEM sem SFB, sendo 3 centrifugações de 380 g a 4 °C por 5 minutos e uma última a 200 g a 4°C por 10 minutos, a remoção de plaquetas foi eficiente e não houve perda significativa no número de PBMCs.

	Método 1	Método 2	Método 3
Antes da remoção das plaquetas	$1,6 \times 10^7/\text{ml}$	$7 \times 10^6/\text{ml}$	$1,5 \times 10^7/\text{ml}$
Depois da remoção das plaquetas	$4 \times 10^6/\text{ml}$	$4 \times 10^6/\text{ml}$	$4,5 \times 10^6/\text{ml}$

Tabela 1- Resultados da remoção de plaquetas. Resultados da remoção de plaquetas nos três métodos analisados.

5.2 Imunofluorescência

Para determinar se as condições de cultivo in vitro levariam a diferenciação das PBMCs em fibrócitos, foi realizada uma análise fenotípica após o cultivo das células por 21 dias. Pudemos observar que os fibrócitos foram positivos para marcações CD11b ou CD45R ou Colágenos Tipo I ou III ou IV, e negativos para marcação de fibronectina. Indicando que, após esse período de cultivo, obtivemos uma cultura predominante de fibrócitos (Fig. 5.1).

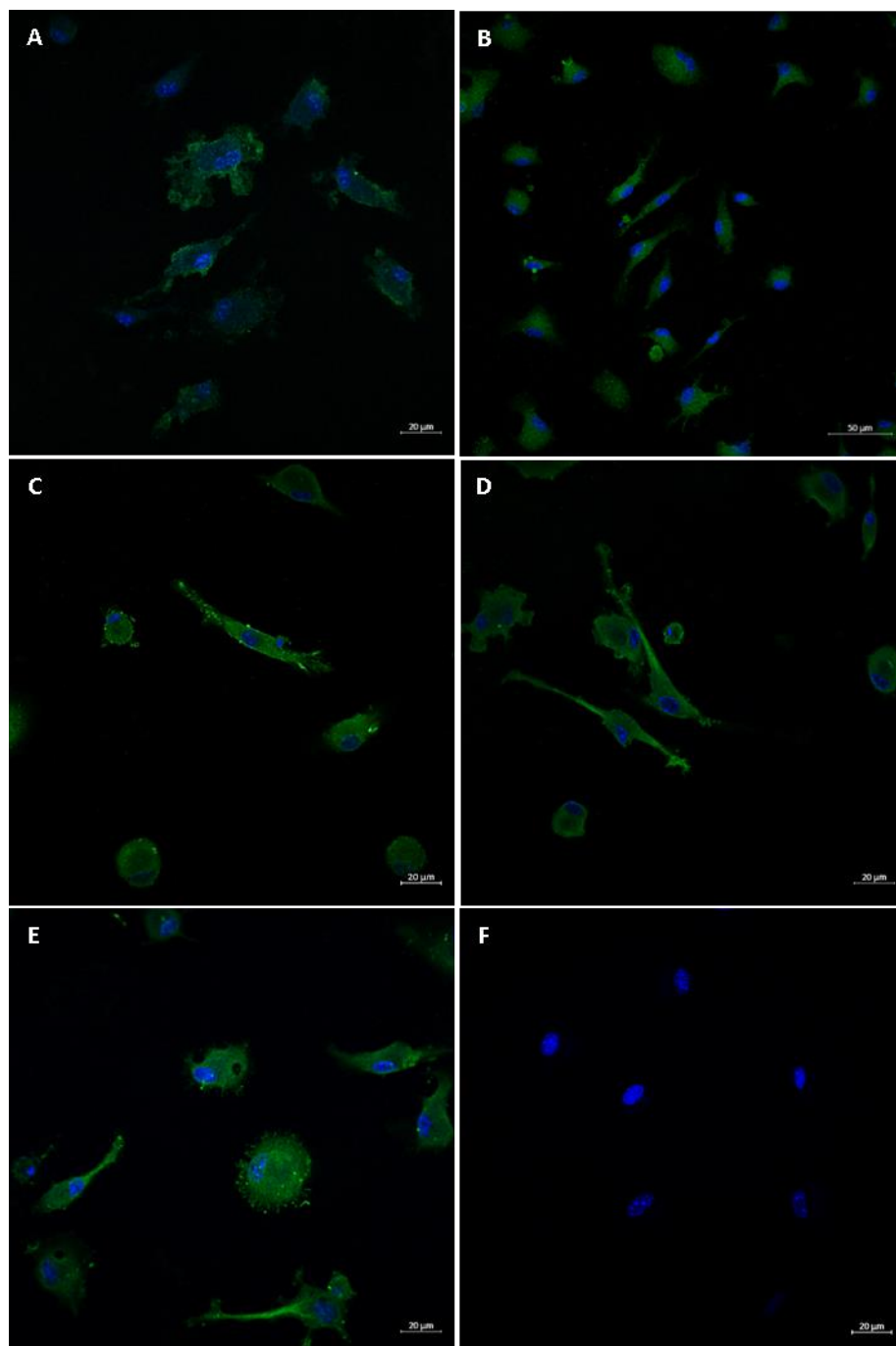


Figura 5.1 - Imunofluorescência. Análise fenotípica de fibrócitos murinos após 21 dias de cultivo. Núcleos corados em azul pelo DAPI e células positivas com citoplasma corado em verde pelo FITC. (A) CD11⁺; (B) CD45⁺; (C) Colágeno I⁺; (D) Colágeno III⁺; (E) Colágeno IV⁺; (F) Fibronectina⁻.

5.3 Infecção de Fibrócitos Murinos

Ao analisarmos as interações in vitro de fibrócitos murinos, derivados de PBMCs, nos tempos de 2, 4, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após infecção por tripomastigotas (TCC) de *T. cruzi*, cepa SC2005, podemos observar que estas células são suscetíveis à internalização e multiplicação dos parasitos (Fig. 5.2).

A avaliação quantitativa da infecção mostrou que, após 2 horas, 36% dos fibrócitos já apresentavam parasitos internalizados com média de 1 parasito por célula, chegando a mais de 96% de fibrócitos infectados após 24 horas, mantendo-se constante até as 72 horas. Não houve uma redução significativa na porcentagem de fibrócitos infectados em períodos pós-infecção posteriores (Fig. 5.3). Às 72 horas após infecção a média de amastigotas intracelular chegou a quase 12 amastigotas por célula, mostrando a capacidade do parasito em estabelecer a infecção nos fibrócitos (Fig. 5.4).

O Índice de infecção, que leva em consideração a porcentagem de células infectadas e o número médio de amastigotas por célula, foi aumentando gradativamente com os tempos analisados (Fig. 5.5).

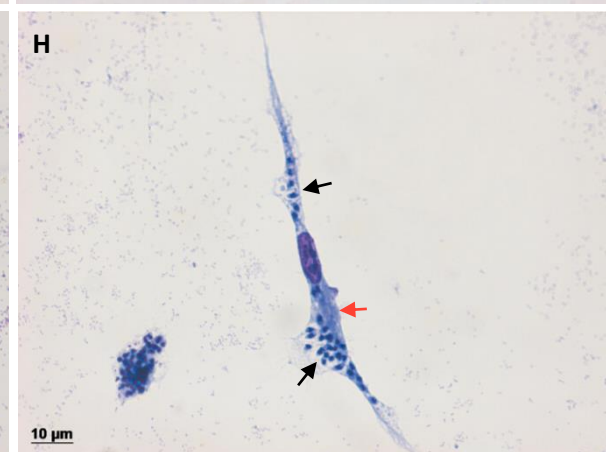
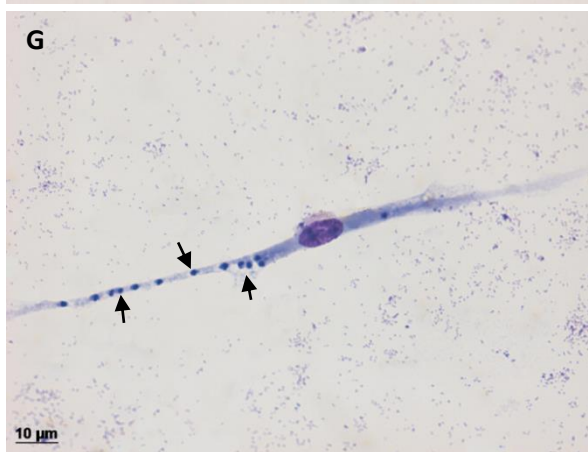
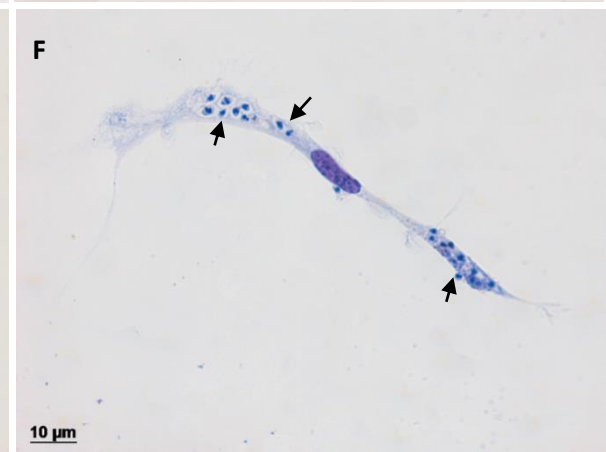
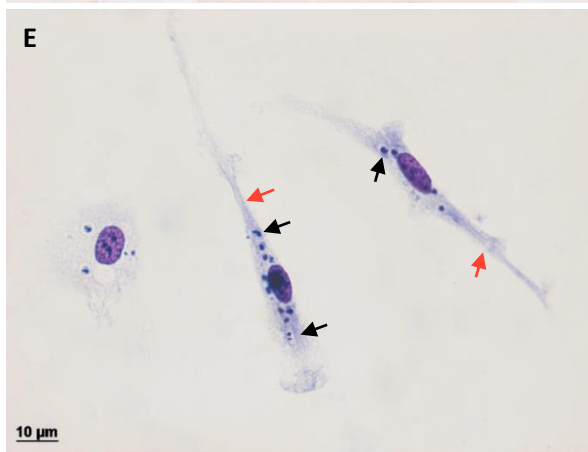
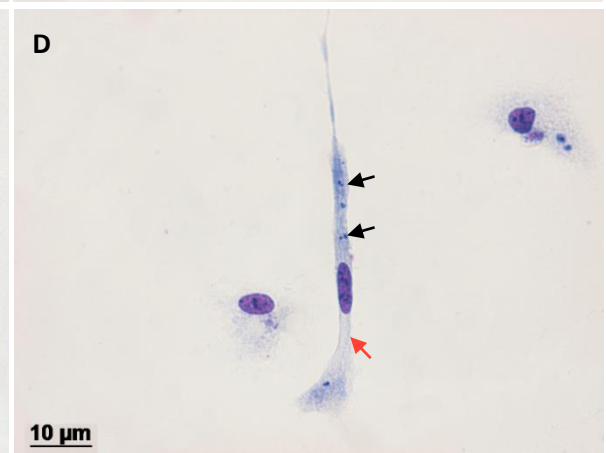
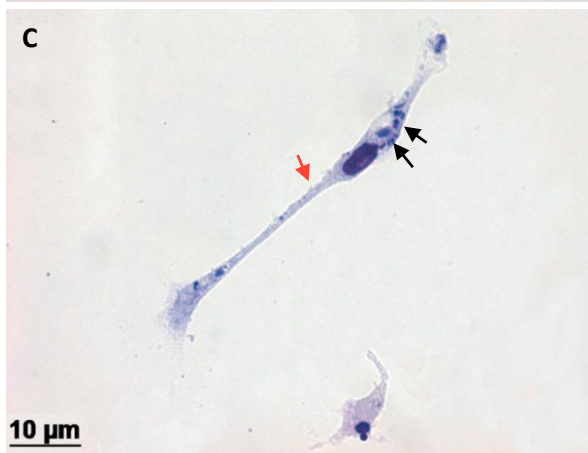
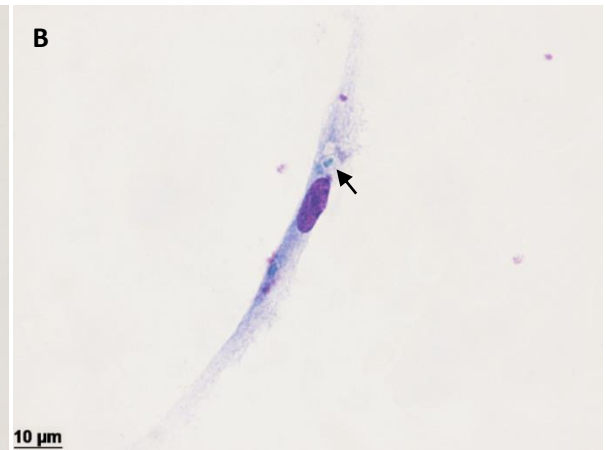
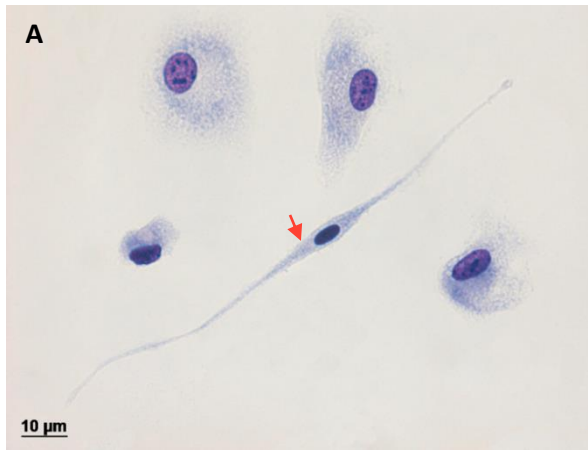


Figura 5.2 - Cinética de infecção. Fibrócitos murinos infectados com formas tripomastigotas derivadas de cultura de células (TCC), do isolado SC2005 de *T. cruzi*. (A) cultura de células controle, sem infecção, observa-se fibrócito com aspecto característico e preservado (seta); (B), (C) e (D) fibrócitos (setas vermelhas) 2, 4 e 6 horas, respectivamente, com presença de formas amastigotas internalizadas (setas vermelhas); (E), (F) e (G) 12, 24 e 48 horas, respectivamente, após infecção, observa-se aumento no número de formas amastigotas (setas pretas) internalizadas pelos fibrócitos (setas vermelhas); (H) fibrócito (seta vermelha) 72 horas após a infecção, mostrando grande número de amastigotas (setas pretas).

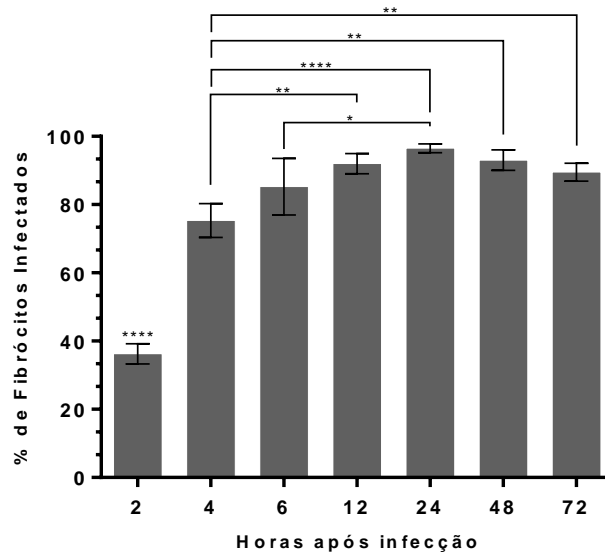


Figura 5.3 - Porcentagem de infecção. Fibrócitos murinos infectados com formas tripomastigotas derivadas de cultura de células (TCC), do isolado SC2005 de *T. cruzi*. Os valores representam a média \pm desvio padrão, realizados em quadruplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$.

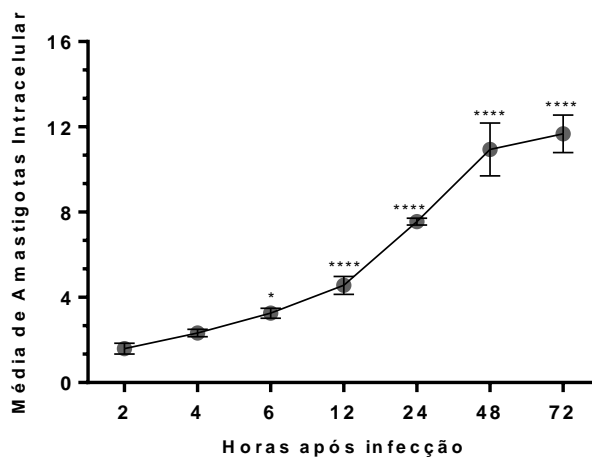


Figura 5.4 - Média de amastigotas intracelular. Fibrócitos murinos infectados com formas tripomastigotas derivadas de cultura de células (TCC), do isolado SC2005 de *T. cruzi*. O gráfico mostra que os parasitos sustentaram a infecção e aumentaram o número de amastigotas intracelulares com o decorrer do tempo. Os valores representam a média \pm desvio padrão, * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$, quando comparado ao tempo de 2h. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata.

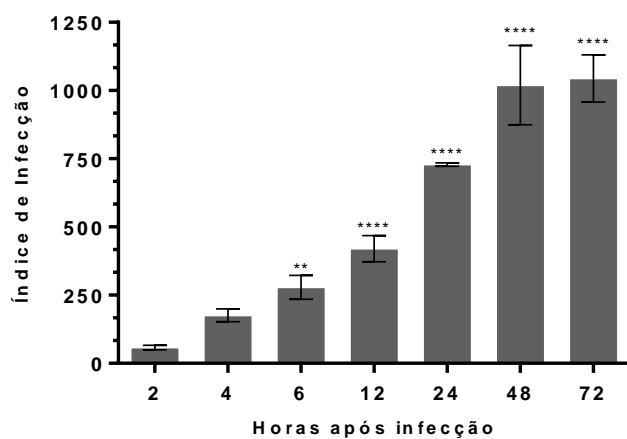


Figura 5.5 – Índice de infecção. Fibrócitos murinos infectados com formas tripomastigotas derivadas de cultura de células (TCC), do isolado SC2005 de *T. cruzi*. Os valores representam a média ± desvio padrão, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado ao o tempo de 2h. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata.

5.4 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

Para determinar se o *T. cruzi* poderia induzir um aumento ou diminuição na produção de NO pelos fibrócitos, medimos os níveis de metabólitos nos sobrenadantes de culturas infectadas e não infectadas (controle).

Não houve um aumento estatisticamente significativo na produção de nitrito por fibrócitos infectados quando comparados com seus respectivos controles nos tempos analisados, o que sugere que as células podem ser suscetíveis à infecção pela incapacidade de produzir NO, um importante mecanismo tripanosomicida. Os níveis de nitrito dos sobrenadantes das células infectadas permaneceram baixos, independentemente do tempo de infecção, porém com uma diferença estatística no tempo de 72h, onde a média do nível de nitrito chegou a 3,07 μ M, quando comparado com os outros tempos de infecção (Fig. 5.6).

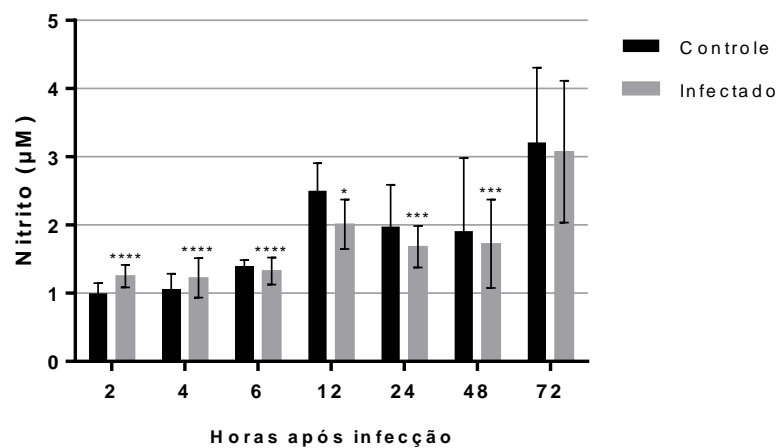


Figura 5.6 - Análise quantitativa da produção de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de fibrócitos murinos infectados com formas tripomastigotas derivadas de cultura de células (TCC), do isolado SC2005 de *T. cruzi*. O nitrito nos sobrenadantes da cultura foi medido pelo método de Griess. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de amostras em quadruplicata. A probabilidade de significância foi comprovada apenas quando comparados os tempos dos fibrócitos infectados com o tempo de 72h após infecção. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

6 DISCUSSÃO

Os fibrócitos foram descritos pela primeira vez por Bucala e colaboradores em 1994, como uma nova subpopulação de leucócitos envolvidos na mediação do reparo tecidual. Ao longo dos anos, vários trabalhos vêm sendo realizados, descrevendo o papel dessa célula e sua importante função principalmente em doenças cardíacas e pulmonares (Mölmann et al., 2006; Chu et al., 2010; King et al., 2011; Reich et al., 2013; Xie et al., 2014).

A origem embrionária dos fibrócitos é controversa. Células de origem mesenquimal são as precursoras de vários constituintes do sangue, de células estruturais dos tecidos cardíacos e ósseos, e de células de sustentação. Em tecidos estruturais e de sustentação, estas células normalmente têm um aspecto irregular em forma de estrela ou em forma de fuso com extensões citoplasmáticas delicadas que formam um entrelaçamento em todo o tecido. Considera-se que as células mesenquimais podem amadurecer em fibroblastos teciduais (Burkitt & Heath, 1997). Estas células, por sua vez desempenham um papel importante no reparo de lesões, e de acordo com alguns relatos descritos na literatura, elas não são de origem hematopoiética. Importante ressaltar que os fibrócitos descritos por Bucala e colaboradores (1994), objeto de estudo no presente trabalho, são células distintas dos fibrócitos de origem mesenquimal, denominados fibroblastos quiescentes.

Há décadas, houve um debate sobre se o tecido conjuntivo cicatrizado seria resultado do crescimento de células mesenquimais adjacentes ou células fibroblastos-*like* ou resultado da entrada hematogênica de células circulantes precursoras dos fibroblastos-*like* (Dunphy, 1963).

Bucala e colaboradores em sua primeira descrição dessas células relataram sua origem mesenquimal, após experimentos de cicatrização de lesões, utilizando implantes subcutâneos (Bucala et al., 1994). Posteriormente, Quan e colaboradores em 2004 descreveram a origem hematopoiética dos fibrócitos após experimentos com marcação de antígenos de superfície como o CD11b, CD45, HLA-DR, CD71, CD80 e CD86. Herzog e Bucala em 2010 estudando reparo tecidual descreveram os fibrócitos como células progenitoras de origem mesenquimal, como esse autor havia sugerido em 1994. Mais tarde, Peng e Herzog em estudos de inflamação crônica, descreveram os fibrócitos humanos como células de origem hematopoiética, o que é

refletido pela expressão de CD45 e LSP-1 (*Leukocytes specific protein-1*) na superfície dessas células (Peng e Herzog, 2012). No modelo murino, esses mesmos autores relataram que os fibrócitos se desenvolvem a partir de monócitos, que também são de origem hematopoiética. Galligan e Fish (2017), em estudos de inflamação e autoimunidade, sugeriram a origem hematopoiética dos fibrócitos murinos e a origem mesenquimal dos fibrócitos humanos, ao contrário dos achados de Peng e Herzog (2012). Nossos resultados mostram que a diferenciação celular a partir de PBMCs originam os fibrócitos, reforçando a ideia da origem hematopoiética destas células.

Vários fatores influenciam na obtenção e diferenciação dos fibrócitos. Uma variedade de protocolos, com diferentes condições de cultivo, tem sido utilizada para a obtenção de fibrócitos humanos, murinos ou suínos (Bucala et al., 1994; Abe et al., 2001; Chesney et al., 1997; Quan e Bucala, 2007). Estudos sobre reparo de lesões in vivo, no modelo murino, mostraram que os monócitos se diferenciam em fibrócitos em poucos dias (Pilling, Vakil, Gomer, 2009). Contudo, no modelo in vitro, diferentes resultados quanto à variação deste tempo são observados.

Com o objetivo de obtenção de fibrócitos a partir de sangue periférico e do estudo do papel dessas células na infecção pelo *T. cruzi* padronizamos um protocolo experimental, in vitro, utilizando PBMCs de camundongos Swiss Webster.

Para a avaliação de quais reagentes e condições poderiam influenciar nesta diferenciação, iniciamos nossos experimentos com a avaliação do uso de alguns anticoagulantes comuns, utilizados na preparação de PBMCs, comparando assim o EDTA com a salina citratada. Nossos resultados mostraram que o rendimento de obtenção de PBMCs foi maior quando se utilizou o EDTA. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Pilling et al, (2009), os quais compararam o uso de EDTA, heparina e citrato-fosfato dextrose na obtenção de fibrócitos humanos e murinos.

A diluição do sangue, assim como a velocidade de centrifugação também são fatores que influenciam na obtenção dos fibrócitos e no rendimento da cultura. Desta forma, testamos diferentes diluições do sangue em PBS ou meio DMEM sem SFB, diferentes velocidades e tempos de centrifugação. Nossos resultados mostraram que a maior diluição, independente do diluente utilizado, com centrifugação em rotação mais elevada e por menor tempo foi a que proporcionou um maior número

de PBMCs. Quan & Bucala (2007) obtiveram melhor rendimento celular utilizando uma diluição menor que a utilizada em nossos experimentos, com um tempo de centrifugação maior e menor rotação. Nossos resultados corroboram os dados da literatura de não haver um consenso na padronização de protocolos de obtenção de fibrócitos e muitas vezes, os autores relatam preferir a utilização de protocolos oferecidos pelo fabricante do reagente utilizado para o gradiente de densidade.

Outro fator avaliado foi a influência das plaquetas na cultura. Em nossos experimentos, a presença de grande quantidade de plaquetas influenciou negativamente o cultivo do fibrócito, dificultando tanto a sua aderência ao substrato, quanto sua observação. Desta forma, a remoção das plaquetas no processo de obtenção dos fibrócitos é fundamental para o estabelecimento e diferenciação destas células, permitindo uma cultura adequada e a melhor identificação morfológica.

A composição do meio de cultivo, assim como a suplementação ou não com SFB são fatores importantes para o cultivo e diferenciação dos fibrócitos. Pilling e Gomer (2007) mostraram que a presença de glicose, piruvato e insulina no meio, afetam a diferenciação dos fibrócitos. Em outro estudo, Pilling, Vakil e Gomer (2009) testaram a influência da suplementação de meios de cultura com glicose, glutamina, ácido linoleico, piruvato, aminoácidos essenciais, dentre outros suplementos e observaram que a suplementação foi fundamental para a diferenciação dos fibrócitos. Nossos resultados, comparando os meios DMEM e DMEM/F-12, mostraram que este último permitiu a diferenciação dos fibrócitos, contrariamente ao observado quando foi utilizado o meio DMEM. Isto ocorreu, provavelmente, devido à ausência de ácido linoléico, vitamina B12, piruvato, HEPES, glicose e menor variedade de aminoácidos essenciais que o DMEM/F-12 em sua formulação.

Quanto a suplementação dos meios ou não com SFB, Pilling e colaboradores (2003), observaram que a suplementação do meio de cultura com soro humano inibiu a diferenciação dos fibrócitos e esta inibição está relacionada com a presença da proteína amiloide P, uma proteína evolucionariamente conservada em diferentes espécies animais. Já a utilização de meio sem soro, permitiu a diferenciação de aproximadamente 0,5-1% dos PBMCs em fibrócitos. Em outro estudo, Pilling, Vakil e Gomer (2009) mostraram que a utilização de meio sem SFB permitiu a diferenciação de aproximadamente 1,5% dos PBMCs em fibrócitos, considerando que

aproximadamente 20% dos PBMCs são monócitos e 8% desses monócitos se diferenciam em fibrócitos. Em nosso estudo, obtivemos resultado semelhante com a utilização do DMEM/F-12 sem SFB, o qual permitiu uma maior diferenciação das células em fibrócitos, que o meio suplementado com SFB. A utilização do meio DMEM, independentemente de estar ou não acrescido de SFB, não permitiu a manutenção das células até o 21º dia de cultivo, tempo necessário para que os fibrócitos se diferenciasssem.

Outro fator importante para a diferenciação e sobrevivência dos fibrócitos é a densidade celular. Vários estudos têm demonstrado que uma alta densidade celular promove a sobrevivência e a diferenciação em muitos tipos celulares (Mehdy & Firtel 1985; Gomer et al., 1991; Barres et al., 1992; Ishizaki et al., 1995; Pilling et al., 2000). Desta forma, o presente estudo avaliou a densidade celular que proporcionou melhor rendimento e diferenciação de fibrócitos. Após a realização de experimentos utilizando as concentrações de 1×10^6 , 2×10^6 , $2,5 \times 10^6$, e 1×10^7 células por poço, nossos dados mostram que a cultura de PBMCs com melhor rendimento de diferenciação em fibrócitos, quanto à confluência e estabilidade celular, foram as cultivadas na concentração de 2×10^6 células por poço (1 mL) em lamínula de vidro. Pilling, Vakil e Gomer (2009) compararam diferentes concentrações de PBMCs para a obtenção de fibrócitos, que variaram de 7.8×10^3 a 1×10^6 células/mL e observaram que 2.5×10^5 células/mL, cultivadas em plástico, foi a concentração que mostrou o melhor resultado quanto a diferenciação de fibrócitos a partir de monócitos originários de PBMCs. Segundo esses autores, a probabilidade do monócito se diferenciar em fibrócito aumenta em função da densidade da cultura, sugerindo que o contato célula-célula, ou fatores secretados por algumas células em uma população de PBMCs potencializem a diferenciação dos fibrócitos.

As condições de cultivo utilizadas por estes autores (utilização de meio sem soro, suplementação e maior densidade celular) potencializam a diferenciação de fibrócitos em comparação com as condições de cultura contendo soro, onde aproximadamente 0,1-1% de PBMCs diferenciam-se em fibrócitos (Bucala et al., 1994; Yang et al., 2002; Wang et al., 2007a). Apesar de não termos podido quantificar as células no nosso experimento, e de não termos mantido as mesmas condições experimentais que Pilling, Vakil e Gomer (2009), podemos hipotetizar que nosso rendimento de fibrócitos foi semelhante ao obtido por eles, principalmente

porque utilizamos uma densidade maior de células (permitindo um maior contato célula-célula) assim como meio de cultura mais rico e sem adição de SFB (que inibe a diferenciação) para estabelecer a nossa cultura

O protocolo estabelecido em nosso estudo para os ensaios de infecção de fibrócitos pelo *T. cruzi*, utilizando o meio DMEM/F-12 sem SFB, permitiu a diferenciação dos fibrócitos após 21 dias. Estes resultados corroboram aos obtidos por Macedo-Silva e colaboradores (2014), que utilizaram o meio DMEM/F-12 sem SFB na infecção de fibrócitos por *Leishmania amazonensis*. Experimentos de obtenção de fibrócitos, a partir de PBMCs humano, cultivados em meio livre de soro, mostraram a diferenciação dos PBMCs em fibrócitos em 5 dias (Pilling et al., 2003; Pilling et al., 2006; Shao et al., 2008; Pilling et al., 2009). Contudo, esses dados discordam dos obtidos por Bucala e colaboradores (1994) e Quan e Bucala (2007) que descreveram a diferenciação fibrocítica após 14 dias de cultivo.

Fibrócitos maduros expressam marcadores de células hematopoiéticas, como CD11a, CD11b, CD45, CD34, CD43 por exemplo, assim como de células mesenquimais indiferenciadas, como colágeno I e III, vimentina e fibronectina (Pilling et al., 2009; Galigan e Fish, 2017). A fim de comprovar a presença de fibrócitos diferenciados, após 21 dias de cultivo, realizamos a marcação das células por imunocitoquímica. Nossos resultados mostraram que todas as células foram positivas para CD11b, CD45R e colágenos Tipo I, III e IV, e negativos para marcação de fibronectina, dados que corroboram com os descritos na literatura para a identificação de fibrócitos (Quan et al., 2004; Pilling et al., 2009; Peng e Herzog, 2012; Macedo-Silva et al., 2014). Contudo, alguns autores relatam a marcação positiva para fibronectina nos fibrócitos (Galigan e Fish, 2017). A marcação para fibronectina é controversa. Reikoff e colaboradores (2011) mostraram que há conflitos na descrição dos resultados, em relação aos níveis de expressão dessa proteína.

Trypanosoma cruzi é um parasito polimórfico que pode invadir e se proliferar na maioria das células de vertebrados in vitro. In vivo alguns autores sugerem um tropismo celular, que apesar de décadas de estudo, ainda é um tema controverso (Fernandes e Andrews, 2012). Embora o *T. cruzi* esteja amplamente disperso entre os diversos órgãos do hospedeiro mamífero, o tecido cardíaco representa um alvo importante para esse parasito (Manque et al., 2011). A fibrose é uma das

manifestações mais significativas da cardiopatia chagásica crônica e encontra-se associada com infiltrados inflamatórios e cardiomiócitos em degeneração (Waghabi, 2004). Caracteriza-se pelo depósito excessivo de componentes da matriz extracelular, inicialmente descrito como uma atividade exacerbada dos fibroblastos (Hao et al., 2015a; Hao et al., 2015b). Evidências tem sugerido a participação de outras células igualmente envolvidas neste processo, como células endoteliais (Zeisberg et al., 2007) e fibrócitos circulantes (Lin et al., 2017).

Os fibrócitos produzem matriz extracelular, a qual contribui negativamente para o desenvolvimento da fibrose renal e pulmonar (King et al., 2011; Reich et al., 2013). Tem sido mostrado igualmente, que fibrócitos circulantes também têm um importante papel na fibrose cardíaca (Lin et al., 2017) e estão em número aumentado no coração em casos de isquemia, hipertensão, falha cardíaca e fibrilação atrial (Möllmann et al., 2006; Fang et al., 2013; Chu et al., 2010; Xie et al., 2014).

Devido à participação do fibrócito no processo de fibrose cardíaca, resolvemos estudar a infecção in vitro de fibrócitos, obtidos de sangue circulante de camundongos Swiss Webster, pelo *T. cruzi*. Nossos resultados mostraram uma susceptibilidade dessas células ao parasito, com infecção a partir de 2 horas, que foi o primeiro ponto avaliado. A infecção foi tempo dependente, se mostrando gradativamente maior no decorrer da infecção. O número de células infectadas atingiu seu platô às 24h após a infecção, mantendo-se estável nos tempos posteriores. No modelo de infecção in vitro de fibrócitos, pela *Leishmania amazonensis*, Macedo-Silva e colaboradores (2014) mostraram resultados opostos, onde as células apesar de se mostrarem infectadas 2h após a infecção, como observado no nosso modelo, mostraram uma infecção decrescente ao longo do experimento, com o desaparecimento total das amastigotas intracelulares 72h após a infecção dos fibrócitos. Porém no modelo macrófago/*T. cruzi* a infecção também se mostra tempo dependente, uma vez que a infecção progride com o passar do tempo, variando em relação a diferentes cepas do parasito e diferentes linhagens de macrófagos (Wollmann et al., 2015).

Quando avaliamos a média de amastigotas intracelulares, observamos que a multiplicação dos parasitos, ao contrário do número de células infectadas, foi ascendente até o final da análise, às 72h após a infecção.

Levando-se em consideração o afluxo de fibrócitos circulantes, o envolvimento dessas células na fibrose cardíaca e a capacidade do *T. cruzi* em infectar os fibrócitos, é possível hipotetizar que estas células possam atuar como “cavalo de Troia” levando o parasito para o interior de alguns órgão e tecidos, como o coração, por exemplo, o mesmo que ocorre com os neutrófilos infectados por *Leishmania*. (John e Hunter, 2008; Laskay, zandbergen, solbach, 2008).

O Óxido nítrico (NO) é a principal molécula que controla a multiplicação intracelular de *T. cruzi* (Gazzinelli et al.,1992; Vespa et al.,1994) em associação com ROS (reactive oxygen species) (Paiva, Medei e Bozza, 2018). Além dos macrófagos, muitas outras células são capazes de produzir NO utilizando as isoformas indutíveis ou constitutivas da enzima NO Sintase (NOS). Células do miocárdio de camundongos, por exemplo, produzem NO in vitro através da indução da NO sintase por citocinas tais como IFN- γ e interleucina (IL) -1 β (Balligand et al.,1994).

Em geral, a produção de NO está associada com a morte do *T. cruzi* dentro do macrófago ativado (Cutrullis, Petray & Corral, 2017). Contudo, Paiva e Bozza (2014) descreveram o crescimento de *T. cruzi* em condições oxidativas, tanto in vitro, no interior de macrófagos, quanto in vivo, e relataram que os antioxidantes foram prejudiciais ao crescimento deste parasito.

No modelo de infecção de fibrócitos por *L. amazonensis*, dados de Macedo-Silva e colaboradores (2014) mostram que fibrócitos, com 2h de infecção, produzem três vezes mais NO que fibrócitos não infectados. Entretanto, esta produção não se manteve, mostrando uma redução de 20% após 6h de infecção e uma equiparação dos níveis de NO às 24h quando se comparou células infectadas com as não infectadas. Essa redução nos níveis de NO estava correlacionada à redução da infecção das células. Em nosso estudo, não observamos diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de NO produzida pelos fibrócitos infectados e pelos não infectados, o que sugere que no modelo de infecção dos fibrócitos pelo *T. cruzi*, a pequena produção de NO pode estar correlacionada ao aumento progressivo da carga parasitária nos fibrócitos, diferente do observado na infecção dessas células pela *L. amazonensis*.

Os fibrócitos são células provenientes de progenitores hematopoiéticos que contribuem para muitas formas de fibrose tecidual, tanto experimentalmente como na clínica. Estas células têm potencial para serem utilizadas como biomarcadores ou

como alvos terapêuticos para doenças humanas. Em nosso estudo mostramos que o *T. cruzi* é capaz de infectar estas células de forma progressiva. Desta forma, estudos complementares de como esta infecção modula as funções do fibrócito, através da produção de citocinas, quimiocinas, dentre outros fatores, influenciando, conseqüentemente a fibrose cardíaca na doença de Chagas, são necessários.

7 CONCLUSÕES

- O protocolo estabelecido nesse trabalho permitiu o isolamento e manutenção de células com características compatíveis à dos fibrócitos;
- As células obtidas foram caracterizadas como fibrócitos;
- Os fibrócitos são suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi* SC2005;
- Os fibrócitos produzem óxido nítrico tanto na presença quanto na ausência do parasito.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol.* 2001; 166: 7556-7562.

Aguiar PH, Furtado C, Repoles BM, Ribeiro GA, Mendes IC, Peloso EF, et al. Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(6):e2279.

Akuzawa N, Nakamura T, Kurashina T, Saito Y, Hoshino J. Antihypertensive agents prevent nephrosclerosis and left ventricular hypertrophy induced in rats by prolonged inhibition of nitric oxide synthesis. *Am J Hypertens.* 1998; 11 (6 Pt 1): 697-707.

Alarcón de Noya, B, Díaz Bello, Z, Colmenares, C et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis.* 2010; 201: 1308–1315.

Angheben A, Boix L, Buonfrate D, Gobbi F, Bisoffi Z, Pupella S et al. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus.* 2015;13(4):540-50.

Araujo PF, Almeida AB, Pimentel CF, Silva AR, Sousa A, Valente SA, Valente VC, Britto MM, Rosa AC, Alves RM, Hagström L, Teixeira AR. Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017; 112(6):437-446.

Argolo AM, et al. *Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil.* Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio, 2008.

Baker DW, Tsai YT, Weng H et al. Alternative strategies to manipulate fibrocyte involvement in the fibrotic tissue response: pharmacokinetic inhibition and the feasibility of directed-adipogenic differentiation. *Acta Biomater.* 2014; 10:3108-16. 10.1016/j.actbio.2014.03.011.

Balligand J, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW et al. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes: characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem.* 1994; 269:27580–27588.

Barres BA, Hart IK, Coles HSR, Burne JF, Voyyodic JT, Richardson WD, Raff MC. Cell-death and control of cell-survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 1992; 70:31–46.

Bastin P, MacRae TH, Francis SB, Matthews KR, Gull K. Flagellar Morphogenesis: Protein Targeting and Assembly in the Paraflagellar Rod of Trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology*. 1999; 19(12): 8191-8200.

Bern C. Chagas' disease. *N Engl J Med*. 2015; 373: 456–66.

Bittencourt AL, Sadigursky M, and Barbosa HS. Congenital Chagas disease. Study of 29 cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1975; 17: 146–159.

Bonney KM, Engman DM. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Curr Mol Med*. 2008; 8: 510-518.

Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med*. 1994; 1: 71-81.

Burkitt Y and Heath H. (Eds.) *Wheater's functional histology*. London: Churchill Livingstone. 1997; 3rd ed., vol. 1, p. 404.

Burleigh BA and Woolsey AM. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol*. 2002; 4: 701–711.

Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1964; 6:93-100.

Cano MI, Gruber A, Vazquez M, Cortés A, Levin MJ et al. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1995; 71(2), 273–278.

Cardoso RN, Macedo FYB, Garcia MN et al. Chagas cardiomyopathy is associated with higher incidence of stroke: a meta-analysis of observational studies. *J Card Fail*. 2014; 20: 931–938.

Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO et al. Congenital Chagas disease: an update. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; Vol. 110(3): 363-368, 363.

Carvalho NB, Atala MM, Leite RM, Shikanai Yasuda MA. Manual de atendimento a pacientes com doença de Chagas : atenção básica 2014/2015. Dados eletrônicos. - São Paulo: Faculdade de Medicina USP, 2015.

Carvalho TU. Organização estrutural Microscopia Óptica. Estudo microscopia óptica. Doença de Chagas. 2017; Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/organizacao-estrutural>. Acesso em junho de 2017.

Castro E. Chagas' disease: lessons from routine donation testing. *Transfusion Medicine*. 2009; 19(1), 16–23.

Castro SL and Menna-Barreto RFS. Clear Shot at Primary Aim: Susceptibility of *Trypanosoma cruzi* Organelles, Structures and Molecular Targets to Drug Treatment. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2017.

Chatelain E and Ioset J-R. Phenotypic screening approaches for Chagas disease drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2017; 13:2, 141-153.

Chesney J, Bacher M, Bender A, Bucala R. The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci*. 1997; 94: 6307-6312.

Chesney J, Metz C, Stavitsky AB, Bacher M, Bucala R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol*. 1998; 160: 419-425.

Chippaux JP, Salas-Clavijo AN, Postigo JR, Schneider D, Santalla JA, Brutus L. Evaluation of compliance to congenital Chagas disease treatment: results of a randomised trial in Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013; 107:1– 7.

Chu PY, Mariani J, Finch S, McMullen JR, Sadoshima J, Marshall T et al. Bone marrow-derived cells contribute to fibrosis in the chronically failing heart. *Am J Pathol*. 2010; 176:1735–42.

Combs TP, Nagajyothi Mukherjee S, de Almeida CJ, Jelicks LA, Schubert W, et al. The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem*. 2005; 280:24085–24094.

Coura JR and Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop*. 2010; 115(1-2):5-13

Coura JR and Borges-Pereira J. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012; 45(3), 286–296.

Coura JR and Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2003; 97: 3-24.

Coura JR and Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(Suppl 1):31-40.

Coura JR, de Abreu LL, Pereira JB, and Willcox HP. Morbidity in Chagas' disease. IV. Longitudinal study of 10 years in Pains and Iguatama, Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985; 80: 73–80.

Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015; 110: 825-30.

Cutrullis RA, Petray PB, Corral RS. MIF-driven activation of macrophages induces killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* dependent on endogenous production of tumor necrosis factor, nitric oxide and reactive oxygen species. Immunobiology. 2017; 222(2):423–31.

Da Silva CV, Luquetti AO, Rassi A, and Mortara RA. Involvement of Ssp-4-related carbohydrate epitopes in mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes. Microbes and Infection. 2006; 8(8), 2120—2129.

De Andrade AL, Zicker F, De Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. Lancet. 1996; 23; 348:1407–13.

De Noya BA and González ON. An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. Acta Tropica. 2015; 151, 94–102.

De Oliveira RB, Troncon LE, Dantas RO and Menghelli UG. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. Am J Gastroenterol. 1998; 93: 884–889.

De Souza. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009; 104 (suppl.1): 89-100.

Dias JC. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease. A clinical epidemiological review. Rev Soc Bras Med Trop. 1989; 22: 147–156.

Dias JCP e Macedo VO. Doença de Chagas. In: COURA, J. R. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitológicas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005; p. 557-593.

Dias JCP. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Epidemiol. Serv. Saúde. 2016; 25(núm. esp.): 7-86.

DiazGranados CA, Saavedra-Trujillo CH, Mantilla M, Valderrama SL, Alquichire C and Franco-Paredes C. Chagasic encephalitis in HIV patients: common presentation of an evolving epidemiological and clinical association. *The Lancet Infectious Diseases*. 2009; 9(5), 324–330.

Dunphy JE. The Fibroblast — A Ubiquitous Ally for the Surgeon. *New England Journal of Medicine*. 1963; 268(25), 1367–1377.

Dutra WO and Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Cur Op Inf Dis Londres*. 2008; v 21 p 287–292.

Espinosa R, Carrasco HA, Belandria F et al. Life expectancy analysis in patients with Chagas' disease: prognosis after one decade (1973–1983). *Int J Cardiol*. 1985; 8: 45–56.

Fang L, Beale A, Ellims AH, Moore XL, Ling LH, Taylor AJ et al. Associations between fibrocytes and postcontrast myocardial T1 times in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc*. 2013; 2:e000270.

Favaloro LE, Peradejordi M, Nagel C. Enfermedad de Chagas y trasplante de órgano. In: Viotti, R., Vigliano, C. (Eds.), *Enfermedad de Chagas, un enfoque práctico basado en la investigación médica*. Editorial Médica. 2015.

Fernandes MC and Andrews NW. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiol*. 2012; Rev 36, 734–747.

Ferrante AWJr. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med*. 2007; 262:408–414.

Ferreira AVM, Segatto M, Menezes Z et al. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes Infect*. 2011; 13(12-13): 1002–1005.

Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. Orally-transmitted Chagas disease. *Med Clin (Barc)*. 2017; 148(3):125-131.

Galligan CL and Fish EN. The role of circulating fibrocytes in inflammation and autoimmunity. *Journal of Leukocyte Biology*. 2017; 93(1): 45-50.

Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop*. 2010; 115:22–27.

Gazzinelli RT, Oswaldo SH, James L et al. The microbicidal activity of interferon- γ treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-

dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhabitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *Eur J Immunol.* 1992; 22:2501–2506.

Gomer RH, Yuen IS, Firtel RA. A secreted 80 × 10³ Mr protein mediates sensing of cell density and the onset of development in *Dictyostelium*. *Development.* 199; 1;112:269–278.

Grab DJ, Lanners H, Martin LN, Chesney J, Cai C, Adkisson HD, Bucala R. Interaction of *Borrelia burgdorferi* with peripheral blood fibrocytes, antigen-presenting cells with the potential for connective tissue targeting. *Mol Med.* 1999; 5: 46-54.

Green LC, Wagner DA, Glowski J, Skipper PL, Wishnok JS and Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 131–138.

Gutierrez FRS et al. Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Infect. Dis.* 2008; v.197, n.10, p.1468-1476.

Hao P, Yang J, Liu Y, Zhang M, Zhang K, Gao F et al. Combination of angiotensin- (1-7) with perindopril is better than single therapy in ameliorating diabetic cardiomyopathy. *Sci Rep.* 2015; 5:8794.

Hao PP, Yang JM, Zhang MX, Zhang K, Chen YG, Zhang C et al. Angiotensin- (1-7) treatment mitigates right ventricular fibrosis as a distinctive feature of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015; 308:H1007- 19.

Hashimoto K and Schofield CJ. Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Parasites & Vectors.* 2012; 5(1), 45.

Herzog EL and Bucala R. Fibrocytes in health and disease. *Experimental Hematology.* 2010; 38(7), 548–556.

Hoare C. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publ. 1972; 547 p.

Hyland K and Engman DM. Further thoughts on where we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease. *Trends Parasitol Londres.* 2006; v. 22 p. 101-102.

Ishida Y, Kimura A, Kondo T, Hayashi T, Ueno M, Takakura N, Matsushima K, Mukaida N. Essential roles of the CC chemokine ligand 3-CC chemokine receptor 5

axis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of macrophage and fibrocyte infiltration. *Am J Pathol.* 2007; 170: 843-854.

Ishizaki Y, Cheng L, Mudge AW, Raff MC. Programmed cell-death by default in embryonic-cells, fibroblasts, and cancer-cells. *Molecular Biology Of The Cell.* 1995; 6:1443–1458.

Jackson Y, Pinto A, Pett S. Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. *Trop Med Int Health.* 2014; 19:212–218.

Jin G & Wong STC. Toward better drug repositioning: prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines. *Drug Discovery Today,* 19(5), 637–44. 2014.

John B and Hunter C. Immunology. Neutrophil soldiers or Trojan Horses? *Science.* 2008; 321(5891), 917–984.

Junqueira LC & Carneiro J. *Histologia basica - Junqueira.* 2001. Guanabara-Koogan.

Junqueira LC e Carneiro J. *Histologia básica – texto/atlas.* 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. 488p

Justi SA and Galvão C. The evolutionary origin of diversity in Chagas disease vectors. *Trends in Parasitology.* 2017; 33(1), 42–52.

Kaiser M, Mäser P, Tadoori LP, Ioset J-R, Brun R Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning. *PLoS ONE* 10(8), 2015.

Kierszenbaum F. Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease. *Acta Parasitol.* 2007; 52: 1-12.

King Jr. TE, Pardo A. Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet.* 2011; 378 (9807), pp. 1949-1961.

K-Laflamme A, Foucart S, Moreau P, Lambert C, Cardinal R, de Champlain J. Sympathetic functions in NG-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: modulation by the renin-angiotensin system. *J Hypertens.* 1998; 16: 63-76.

Kurusu S, Ozono R, Oshima T, Kambe M, Ishida T, Sugino H et al. Cardiac angiotensin II type 2 receptor activates the kinin/NO system and inhibits fibrosis. *Hypertension.* 2003; 41 (1): 99-107.

Laranja FS, Dias E, Nobrega G, Miranda A. Chagas disease. A clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation*. 1956; 14: 1035–1060

Laskay T, van Zandbergen G and Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology*, 2008 213(3–4), 183–191.

Lechuga GC. Estudo da atividade de derivados semissintéticos e sintéticos nas formas evolutivas do *trypanosoma cruzi* e linhagem celular. Universidade Federal Fluminense: xiii, 51 f. :il. [s.n.], 2011.

Lin RJ, Su ZZ, Liang SM, et al. Role of Circulating Fibrocytes in Cardiac Fibrosis. *Chinese Medical Journal*. 2016; 129(3):326-331.

Luvara G, Pueyo ME, Phillippe M, Mondet C, Savoie F, Henrion D, et al. Chronic blocked of NO synthase activity induces a proinflammatory phenotype in the arterial wall: prevention by angiotensin II antagonism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18: 1408-16.

Macedo-Silva RM, Santos CLP, Diniz VA, Carvalho JJ, Guerra C, Côrte-Real S. Peripheral blood fibrocytes: new information to explain the dynamics of *Leishmania* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2014; vol.109, n.1, pp.61-69.

Maldonado RA, Molina J, Payares G, Urbina JA. Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother* 37:1353-1359, 1993.

Manque PA, Probst C, Pereira MCS, Rampazzo RCP, Ozaki LS, Pavoni DP, Buck GA et al. *Trypanosoma cruzi* Infection Induces a Global Host Cell Response in Cardiomyocytes. *Infection and Immunity*. 2011; 79(5), 1855–1862.

Matsuoka H, Nakata M, Kohno K, Koga Y, Nomura G, Toshima H et al. Chronic L-arginine administration attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1996; 27: 14-8.

Mehdy MC, Firtel RA. A secreted factor and cyclic AMP jointly regulate cell-type-specific gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Cell Biol*. 1985; 5:705–713.

METZ CN. Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound healing. *Cell Mol Life Sci*. 2002; v.60, n.7, p.1342-1350.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. Bol Epidemiol. 2015; 46(21):1-9.

Ministério da Saúde. Vigilância em saúde - Zoonoses. Cadernos de Saúde Pública. 2009; 1(22), 7–45.

Molina I, Gomez i Pratt J, Salvador F, Trevino B, Sulleiro E et al. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. N Engl J Med 2014; 370: 1899–908.

Möllmann H, Nef HM, Kostin S, von Kalle C, Pilz I, Weber M et al. Bone marrow-derived cells contribute to infarct remodelling. Cardiovasc Res. 2006; 71:661- 71.

Molyneux DH, Savioli L, Engels D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. Lancet. 2017; 389(10066), 312–325.

Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz. 2003; 98(5), 577–591.

Moncayo A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz. 1999; 94(suppl 1), 401–404.

Moore BB, Thannickal VJ, Galen B. Bone marrow-derived cells in the pathogenesis of lung fibrosis. Curr Respir Med Ver. 2005; 1: 69-76.

Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr. et al. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. N Engl J Med. 2015; 373(14):1295–306.

Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. Cellular microbiology. 2012; 14(5):634-643.

Nagajyothi F, Weiss LM, Silver DL, Desruisseaux MS, Scherer PE, Herz J et al. *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5:e953.

Ngo MA, Müller A, Li Y et al. Mol Cell Biochem. 2014; 392: 187.

Nguyen T and Waseem M. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2018.

Nihlberg K, Larsen K, Hultgardh-Nilsson A, Malmström A, Bjermer L, Westergren-Thorsson G. Tissue fibrocytes in patients with mild asthma: a possible link to thickness of reticular basement membrane? *Respir Res.* 2006; 29: 50.

Nunes MCP, Guimarães Júnior MH, Diamantino AC et al. Cardiac manifestations of parasitic diseases. 2018.

Nunes, MCP, Barbosa, MM, Ribeiro, ALP, Barbosa, FBL, Rocha, MOC. Ischemic cerebrovascular events in patients with Chagas cardiomyopathy: a prospective follow-up study. *J Neurol Sci.* 2009; 278: 96–101.

PAHO - Pan American Health Organization. General Information - Chagas Disease. Washington (DC); 2016. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856%3A2011-informacion-general-enfermedad-chagas&catid=3591%3Achagas-disease&Itemid=0&lang=en < acesso em Abril de 2018.

Paiva CN, Bozza MT. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? *Antioxid Redox Signal.* 2014; 20(6):1000–37.

Paiva CN, Medei E, Bozza MT. ROS and *Trypanosoma cruzi*: Fuel to infection, poison to the heart. *PLoS Pathog.* 2018; 14(4): e1006928.

Pecoul B, Batista C, Stobbaerts E et al. The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(2): e0004343.

Peng H, Herzog EL. Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation. *Curr Opin Pharmacol.* 2012; 12: 491-496.

Pereira LM, Mandarim-De-Lacerda CA. Stereology of cardiac hypertrophy induced by NO blockade in rats treated with enalapril and verapamil. *Anal Quantitat Cytol Histol.* 2001; 23: 330-8.

Pérez-Ayala A, Pérez-Molina JA, Norman FF, Monge-Maillo B, Faro MV, López-Vélez R. Gastro-intestinal Chagas disease in migrants to Spain: prevalence and methods for early diagnosis. *Ann Trop Med Parasitol.* 2011; 105: 25–29.

Pérez-Molina JA and Molina I. Chagas disease. *Lancet.* 2017; 391(10115), 82–94.

Pilling D, Akbar AN, Shamsadeen N, Scheel-Toellner D, Buckley C, Salmon M. High cell density provides potent survival signals for resting T-cells. *Cell Mol Biol.* 2000; 46:163–174.

Pilling D, Buckley CD, Salmon M, Gomer RH. Inibição da diferenciação de fibrócitos pelo soro amilóide P. *Journal of immunology*. 2003; 171 (10): 5537-5546.

Pilling D, Fan T, Huang D, Kaul B and Gomer RH. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS ONE*. 2009. 4(10), 31–33.

Pilling D, Tucker NM, Gomer RH. Aggregated IgG inhibits the differentiation of human fibrocytes. *J Leukoc Biol*. 2006; 79: 1242-1251.

Pilling D, Vakil V, Gomer RH. Improved serum-free culture conditions for the differentiation of human and murine fibrocytes. *Journal of immunological methods*. 2009; 351(1-2):62-70.

Pinazo MJ, Miranda B, Rodríguez-Villar C et al. Recommendations for management of Chagas disease in organs and hematopoietic tissue transplantation programs in nonendemic areas. *Transplant. Rev*. 2011; 25:91–101.

Pinto AY, Valente SA, Valente VDC, Ferreira AG Junior, Coura, JR. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41: 602–614.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infec Dis*. 2001; 1:92-100.

Quan TE and Bucala R. Culture and Analysis of Circulating Fibrocytes. *Arthritis—Laboratory Manuals*. 2. Laboratory Techniques and Procedures—Laboratory Manuals. 2007; W1 ME9616J v.135-136 / WE 25 A787 2007].

Quan TE, Cowper S, Wu SP, Bockenstedt LK, Bucala R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36: 598-606.

Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010; 375:1388–402.

Rassi A Jr, Rassi SG, Rassi A. Sudden death in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol*. 2001; 76: 75–96.

Rassi Jr A, Marin NJA, Rassi A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2017; 112(3): 224-235.

Rassi, A and Little, WC. Chagas' heart disease. Clin Cardiol. 2000; 23: 883–889.

Reich B, Schmidbauer K, Rodriguez Gomez M, Johannes Hermann F, Göbel N, Brühl H et al. Fibrocytes develop outside the kidney but contribute to renal fibrosis in a mouse model. Kidney Int. 2013; 84:78–89.

Reilkoff RA, Bucala R, Herzog EL. Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation. Nat Rev Immunol. 2011; 11: 427-435.

REY L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4 ed. Rio de Janeiro: editora Guanabara koogan. 2008; p. 295-343.

Rossi MA. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. Int J Cardiol, 1991; 30: 335-340.

Salvador F, Treviño B, Sulleiro E et al. *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic country: epidemiological and clinical profile. Clin Microbiol Infect. 2014; 20: 706–712.

Shao DD, Suresh R, Vakil V, Gomer RH, Pilling D. Pivotal Advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation. Journal of Leukocyte Biology. 2008; 83:1323–1333.

Shapiro TA and Englund PT. The Structure and Replication of Kinetoplast DNA Annual Review of Microbiology. 1995; 49:1, 117-143.

Shikanai-Yasuda MA and Carvalho NB. Oral Transmission of Chagas Disease, Clinical Infectious Diseases. 2012; Volume 54, Issue 6, Pages 845–852.

Shoemaker JP, Hoffman RV, Jr, Huffman DG. *Trypanosoma cruzi*: preference for brown adipose tissue in mice by the Tulahuen strain. Exp Parasitol. 1970; 27:403–407.

Sibley LD. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. Immunological Reviews. 2011; 240: 72-91.

Siriano LR. Prevalência da doença de Chagas em gestantes em Goiânia-GO e integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* em lactentes de mães infectadas. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, GO. 2013; 134 f.

Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 59:526–9.

Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, Grisard EC. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2008; 60(1), 25–32.

Suga H, Rennert RC, Rodrigues M, Sorkin M, Glotzbach JP, Januszyk M, Gurtner GC. Tracking the elusive fibrocyte: Identification and characterization of collagen producing hematopoietic lineage cells during murine wound healing. *Stem Cells.* 2014; 32(5), 1347–1360.

Swynghedauw B. Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling *Physiological Reviews.* 1999; 79:1, 215-262.

Tarleton RL. *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease: cause and effect. In KM Tyler, MA Miles (eds.), *World class parasites: American trypanosomiasis*, Kluwer Academic Publisher. 2003; Vol. 7 p. 107-116.

Teixeira A. *Doença de Chagas e evolução / Antonio Teixeira – Brasília: Edit Universidade de Brasília: Finatec 2007.*

Teixeira ARL, Gomes C, Nitz N, Sousa AO, Alves RM, Guimaro MC, Cordeiro C, Bernal FM, Rosa AC, Hejna J, Leonardecz E, Hecht MM. *Trypanosoma cruzi* in the chicken model: Chagas-like heart disease in the absence of parasitism. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(3):e1000.

Tomasini N. Introgression of the Kinetoplast DNA: An Unusual Evolutionary Journey in *Trypanosoma cruzi* *Curr Genomics.* 2018; 19(2): 133–139.

Torrice F. Chagas congênito. In: Viotti, R., Vigliano, C. (Eds.), *Enfermedad de Chagas, un enfoque práctico basado en la investigación médica.* Editorial Medica Panamericana. 2015; pp. 117–128.

Tovar Acero C, Negrete Peñata J, González C, León C, Ortiz M, Chacón Pacheco J, Monterrosa E, Luna A, Ricardo Caldera D, Espitia-Pérez L. New Scenarios of Chagas Disease Transmission in Northern Colombia. *J Parasitol Res.* 2017; 1-5.

Tyler KM and Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. International Journal for Parasitology. 2001; 31(5–6), 472–481.

Urbina JA, Lazard K, Marchan E, Visbal G, Aguirre T, Piras MM, Piras R, Maldonado RA, Payares G, de Souza W. 1993. Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. Antimicrob Agents Chemother 37:580-591, 1993.

Vespa GNR, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi* induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. Infect Immun. 1994; 62:5177–5182.

Viotti R, Vigliano C, Lococo B et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. Ann Intern Med. 2006; 144: 724–734.

Viotti RJ, Vigliano C, Laucella S et al. Value of echocardiography for diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease cardiomyopathy without heart failure. Heart. 2004; 90: 655–660.

Waghabi, MC. Fisiopatologia da fibrose cardíaca chagásica: papel de TGF-Beta. Rio de Janeiro; 2004. xiii,87 p. ilus, s.n; jul.12.

Wang JF, Jiao H, Stewart TL, Shankowsky HA, Scott PG, Tredget EE. Fibrocytes from burn patients regulate the activities of fibroblasts. Wound Repair Regen. 2007; 15: 113-121.

Wegner DH and Rohwedder RW. The effect of nifurtimox in acute Chagas' infection. Arzneimittelforschung. 1972; 22: 1624–1635.

WHO (World Health Organization). Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> Acesso em Abril de 2017.

WHO (World Health Organization). Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <http://www.who.int/chagas/disease/transmission/en/> > Acesso em Abril de 2018.

WHO (World Health Organization). Unprecedented progress against neglected tropical diseases, WHO reports. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/detail/19-04-2017-unprecedented-progress-against-neglected-tropical-diseases-who-reports> < Acesso em Abril de 2018.

WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec.* 2015; 90: 33–43.

WHO. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert Committee. WHO technical report series, 905. World Health Organization. 2002.

Wollmann GEM, Ribeiro AR, Passalacqua TG, Almeida L, Graminha MAS, Rosa JA. Índice de infecção em macrófagos peritoneais por cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de *Rhodnius montenegrensis*. *Rev. Ciên Farm Básica Apl.* V.36 Supl. 1, 2015.

Xie X, Liu Y, Gao S, Wu B, Hu X, Chen J. Possible involvement of fibrocytes in atrial fibrosis in patients with chronic atrial fibrillation. *Circ J.* 2014; 78:338- 44.

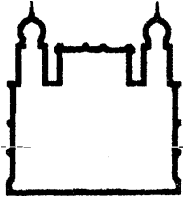
Yang L, Scott PG, Giuffre J, Shankowsky HA, Ghahary A, Tredget EE. Peripheral blood fibrocytes from burn patients: Identification and quantification of fibrocytes in adherent cells cultured from peripheral blood mononuclear cells. *Laboratory Investigation.* 2002; 82(9), 1183–1192.

Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, et al. Endothelial- to- mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med.* 2007; 13:952- 61.

Zeledón R, Bolaños R, Rojas M. Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. *Acta Trop.* 1984; v.41 p.39-43.

Zorzi RLA, Pereira LMM, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effect of enalapril in spontaneously hypertensive rats cardiac remodeling with nitric oxide synthesis blockade. *J Cell Mol Med.* 2002; 6 (4): 599-608.

9 ANEXOS



Instituto Oswaldo Cruz

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

LICENÇA

L-008/2017

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-001/2017), intitulado “Avaliação in vitro da infecção de fibrócitos murinos pelo *Trypanosma cruzi* e sua relação com a produção da matriz extracelular”, sob a responsabilidade de **KATIA DA SILVA CALABRESE** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 31/12/2020 e inclui o uso total de:

Animal	Espécie ou linhagem	quant (total) ♂	Idade	Peso	Origem
camundongo	Swiss webster	400	4 semanas	15-18g	CECAL
camundongo	BALB/cAn	480	4 semanas	15-18g	CECAL

Observação: Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 27 de março de 2017.

Flávio Alves Lara

**Coordenador da CEUA/Instituto
Oswaldo Cruz Fundação
Oswaldo Cruz**

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-
Instituto Oswaldo Cruz Av. Brasil, 4365 -
Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1056