



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Jéssica Isis Oliveira de Paula

**Diferentes abordagens para a descoberta de novos alvos terapêuticos contra
a doença de Chagas**

Rio de Janeiro

2019

Jéssica Isis Oliveira de Paula

**Diferentes abordagens para a descoberta de novos alvos terapêuticos contra a
doença de Chagas**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Marcia Cristina Paes

Coorientadora: Prof.^a Dra. Natália Pereira de Almeida Nogueira

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

P324 Paula, Jéssica Isis Oliveira de.
Diferentes abordagens para a descoberta de novos alvos terapêuticos contra a
doença de Chagas / Jéssica Isis Oliveira de Paula – 2019.
129 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Marcia Cristina Paes.
Coorientadora: Prof.^a Dra. Natália Pereira de Almeida Nogueira.

Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Chagas, Doença de - Teses. 2. *Trypanossoma cruzi* - Teses. 3. Espécies de
oxigênio reativas - Teses. 4. Terapêutica. I. Paes, Marcia Cristina. II. Nogueira,
Natália Pereira de Almeida. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.937.3

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese,
desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Jéssica Isis Oliveira de Paula

**Diferentes abordagens para a descoberta de novos alvos terapêuticos contra a
doença de Chagas**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 01 de novembro de 2019.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Natália Pereira de Almeida Nogueira
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof.^a. Marcia Cristina Paes (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Silvia Amaral Gonçalves Dias
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. José Roberto Machado e Silva
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. José Roberto Meyer Fernandes
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Antônio Galina Filho
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico a minha família, aos amigos, aos companheiros de pesquisa e todos aqueles que persistem apesar das adversidades da vida

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A minha família. Meu pai Rene, que me passou valores de honestidade e justiça, os quais foram essenciais para minha formação profissional e pessoal. Aos meus irmãos, Jackson e Jennifer, que ajudaram-me na construção do indivíduo que sou hoje. Aos meus sobrinhos, Igor e Ivan, pelo frescor da vida em seus sorrisos e olhares. A minha tia Mary, que com todo seu amor fez mais leve meus dias mais cansados. A minha mãe Sandra, cujos 16 anos de ausência inalteraram a dor, mas também seu valor minha mãe, obrigada por me mostrar a pureza e bondade na sua forma simples de levar a vida.

Aos amigos da vida. A Thays que o tempo trouxe de volta, e que a rede social jamais deixará se afastar novamente rs. Aos amigos que a capoeira UERJ trouxe e que eu levarei para a vida, Ciça e Juliana, obrigada pelas risadas, pelas músicas e pelas conversas tão radiantes.

Aos amigos da biologia, que passaram por todas as minhas fases. Antônio, que mesmo mais distante fisicamente hoje, ainda faz parte da minha vida. A Laila, cuja a biologia foi nosso reencontro, formando longos 15 anos de amizade. Obrigada amigos pelos risos e apoio.

Aos professores do departamento de bioquímica da UERJ, que sempre tiveram dispostos a me ajudar em todos os momentos. Obrigada professores Graça, Marsen, Kátia, Jacyara, Jayme, Frederico e Tatiana. A professora Ana por toda a paciência e dedicação com meus PCRs.

Aos amigos científicos. Aos novos, Bruna, Raquel, Felipe. Aos mais antigos, Thayane por todos os memes e desabafo, Nathália e a Mariana que me proporcionaram tantas alegrias e aprendizado. A Girlaine, por todos momentos de alegria e pelos conselhos valiosos. Ao grupo da professora Ana, Orlando, Jennifer, Patrícia e Lilian pelas trocas de idéias.

Aos técnicos do departamento. Paulinho por todo carinho e ensinamento ao longos desses 11 anos. A Natália, que no curto momento que trabalhamos juntos, no meio de tantas risadas nasceu uma linda amizade, obrigada pela torcida. A Amanda pelas risadas e trocas de experiências sempre bem divertidas. A Shirley pelos momentos de descontração e pela ajuda. Ao Beto, Lin, e Denise por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Aos professores do departamento de Parasitologia, Silvia, Patrícia e Eduardo.

Agradeço ao professor Marcelo Jacobs-Lorena pela oportunidade de realizar parte da minha pesquisa no seu laboratório na Johns Hopkins Bloomberg School, bem como pelos seus ensinamentos e meu aperfeiçoamento profissional. Todo meu carinho e gratidão ao seu

grupo, que me recebeu muito bem, Sung-Jae, Wayne, Patrícia, Joel e do Chris, obrigada pela paciência e por me ajudarem no laboratório.

Ao meu grupo de laboratório. O grupo cruzi, em que apesar das mudanças ao longos anos, com quedas e reconstruções de muros, partidas e chegadas...me ajudou bastante na minha formação. Aos que tive o privilégio de orientar diretamente, Aline e Jon Jon, obrigada por me ensinarem a ensinar. A Carol, pequena no tamanho mas grande de coração e a carumila, maior em tamanho, mas igual em generosidade, meninas muito obrigada pelo apoio, pela torcida, pela amizade, o sorriso e o abraço de vocês foram fundamentais nos momentos mais down. A nova geração, Isabela, Luana, Gabi e Hanna, foram alguns meses antes de terminar o doutorado, mas é revigorante ver o início de uma nova geração de alunos. A professora Natália, que me acompanhou em toda minha trajetória, obrigada pelos conselhos e apoio. Aos que não acompanharam meu doutorado, mas participaram da minha formação inicial, Cíntia e Maurício. A Francis pelos 11 anos trabalho juntos e pelos jogos do Flamengo. A Mariana, foram poucos anos, mas foi como se fosse uma vida. Ao Gustavo, cuja palavras não seriam suficientes para descrever a minha gratidão...tem 6 mil reais?

A minha orientadora desde a iniciação científica, Marcia. Obrigada por abrir as portas do seu laboratório e me ajudar nessa longa caminhada científica. A genuinidade da nossa relação foi fundamental para meu amadurecimento, tanto pessoal quanto profissional. Muito obrigada pela sua generosidade e paciência.

Sinto-me agraciada pelas pessoas que encontrei no meu caminho, foi com a ajuda delas que realizei este trabalho, e foram elas que me tornaram que sou hoje. Obrigada a todos pelo carinho e pela torcida.

Agradeço também as agências de fomento que financiaram este trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Mil nações moldaram minha cara. Minha voz uso pra dizer o
que se cala. Ser feliz no vão, no triste, é força que me embala

Douglas Germano

RESUMO

PAULA, Jéssica Isis Oliveira de. *Diferentes abordagens para a descoberta de novos alvos terapêuticos contra a doença de Chagas*. 2019. 129 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

O *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da doença de Chagas. O parasito obrigatoriamente necessita entrar na célula para replicar e expandir a infecção no hospedeiro vertebrado. Os tripomastigotas são classicamente descritos como as formas infectantes do *T. cruzi*, e possuem a capacidade invadir a célula hospedeira. Após a invasão na célula do vertebrado, o parasito sofre o processo de amastigogênese, no qual formas tripomastigotas se diferenciam para as formas amastigotas, que proliferam. As etapas de invasão intracelular e amastigogênese são essenciais para o estabelecimento do parasito, sendo alvos de pesquisa para desenvolvimento de drogas. Atualmente são utilizados dois fármacos para o tratamento: benznidazol e nifurtimox. Ambos os fármacos apresentam efeitos adversos que provocam a interrupção do tratamento pelo paciente, além de terem baixa eficácia na fase crônica da doença de Chagas, tornando importante o desenvolvimento de novas drogas. Existem basicamente duas abordagens no desenvolvimento de novos fármacos: a fenotípica e a baseada em alvo. Nesse trabalho foi utilizada a abordagem baseada em alvo. Dentro dessa abordagem foram empregadas duas estratégias diferentes. A primeira consistiu em entender a biologia da relação do parasito e da célula hospedeira. Nesse contexto, estudamos o papel das ROS, mais especificamente o H₂O₂, na infecção intracelular. Uma vez que é observada a produção de ROS no fagolisossomo e que nesse compartimento ocorre a sinalização para a amastigogênese, investigou-se a influência de H₂O₂ nesse processo. Foi observado que o H₂O₂ aumentou em 30% a diferenciação após duas horas de indução por pH ácido. No entanto, dentre os antioxidantes testados, apenas PEG-catalase, uma enzima que dismuta diretamente H₂O₂ em O₂ e H₂O, foi capaz de inibir a indução da amastigogênese por estas ROS. Observou-se que o H₂O₂ foi capaz de ativar uma serina/treonina fosfatase, bem como, o ácido ocaídico (OKA) inibidor de PP2A, reverteu o efeito deste ROS na amastigogênese. Corroborando a participação de ROS, observou-se que a indução à diferenciação por pH ácido promoveu a produção de H₂O₂ após 1 hora, sendo essa reduzida posteriormente. Ao avaliar a expressão gênica da superóxido dismutase do *T. cruzi*, observou-se que a isoforma mitocondrial (Fe-SODA) foi modulada positivamente após 60 minutos e 90 minutos de indução à diferenciação. Além disso, foi observada a redução do consumo de oxigênio e capacidade máxima de respiração, bem com a redução do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) após 60 e 120 minutos de indução à amastigogênese. Considerando esses resultados, em que a disfunção mitocondrial é acompanhada pela perda de $\Delta\Psi_m$, a produção de H₂O₂ observada pode ser de origem mitocondrial promovida pela abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP). De fato, o inibidor de mPTP, ciclosporina, e o antioxidante mitocondrial, mitoTEMPO, foram capazes de inibir a produção de H₂O₂ induzida pelo pH ácido. Em conjunto, esses resultados demonstraram que o H₂O₂ atuou como molécula sinalizadora para diferenciação de formas tripomastigotas para amastigotas em *T. cruzi*. A segunda estratégia consistiu na varredura da superfície de tripomastigotas com uma biblioteca de fagos. Após o *biopanning*, foram identificados dois clones com afinidade para as formas tripomastigotas, N3 e N1. O peptídeo expresso no clone N3 foi sintetizado e ensaios *in vitro* de ligação demonstraram a especificidade do peptídeo com as formas infectantes do *T. cruzi*. Além disso, o peptídeo mostrou-se bioativo, inibindo a invasão em células Vero. Desta forma, o peptídeo N3 se liga à uma molécula de superfície de *T. cruzi* que é importante para a invasão celular.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Amastigogênese. ROS. *Phage display*. *Biopanning*.

Abordagem baseada em alvo

ABSTRACT

PAULA, Jéssica Isis Oliveira de. *Differents approaches in target-based drug discovery against Chagas Disease*. 2019.129 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Trypanosoma cruzi is the causative agent of Chagas disease. The parasite needs to enter in the host cell to grow and expand infection. Trypomastigotes are classically infective forms of *T. cruzi*, and they are able to invade host cell. After the invasion of the mammalian cell, parasites start amastigogenesis process, in which trypomastigotes forms differentiate into amastigotes that proliferate. Those steps of intracellular invasion and amastigogenesis are essential to parasite. Currently, two drugs are used to treatment: benznidazol and nifurtimox. Both drugs show side adverses effects that causes treatment interruption by the patient, due to of the low efficacy in chronic phase of Chagas diseases, making important the development of new drugs. Basically, two aproaches are applied in drugs development: phenotype and targed-based. In this work, we used two strategies in the targed-based approach. The first was to study the parasite biology relationship with host cell. In this context, we search ROS relation, especifically H_2O_2 , in the intracelular infection. Once ROS are produced in the phagolysosome and in this compartment has signaling to amastigogenesis, we investigated the H_2O_2 influence in this process. We observed that H_2O_2 increased 30% of differentiation after two hours of induction by low pH. However, among antioxidant molecules tested, only PEG-catalase, enzyme that neutralizes directly H_2O_2 inhibited amastigogeneses improvement ROS-induced. We observed that H_2O_2 increased a serine/threonine phosphatase activity, as well as PP2A inhibitor okadaic acid (OKA) reverted H_2O_2 effect upon amastigogenesis. Corroborating ROS involvement, observed that differentiaton induced by acid pH produced H_2O_2 after one hour, being reduced later. When we evaluated the superoxide dismutase gene expression of *T. cruzi*, we observed that mitochondrial isoform (Fe-SODA) were up regulated after 60 minutes and 90 minutes differentiation induction. Furthermore, we detected a reduction in the oxygen consumption and maximal eletron tranference system capacity, as well as loss in the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) after 60 minutes and 120 minutes of amastigogenese induction. In consideration of these results, wherein mitochondrial dysfunction is followed by loss of $\Delta\Psi_m$, H_2O_2 production observed can be from mitochondrial by mitochondrial permeability transition pore (mPTP). Indeed, mPTP inhibitor cyclosporin and mitochondrial antioxidant mitoTEMPO reduced H_2O_2 generation induced by low pH. Together, this results showed that H_2O_2 act as signaling molecule to differentiation. The second strategy were trypomastigote surface screening by phage display library. After *biopanning*, were identified two high affinity clones, N3 and N1. The peptide express in N3 clone were synthetized and *in vitro* bound assays showed peptide specificity to infective forms of *T. cruzi*. Furthermore, peptide were active inhibiting Vero cells invasion. Thus, N3 peptide bound in a surface molecule of *T. cruzi* that is important to cell invasion.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Amastigogenesis. ROS. Phage display. Biopanning. Target-based approach.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - História natural da doença de Chagas.....	18
Figura 2 - Distribuição global da doença de Chagas (2006-2010).....	20
Figura 3 - Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i>	24
Figura 4 - Formas tripomastigota e amastigota de <i>T. cruzi</i>	29
Figura 5 - ROS: A dose é o que determina o seu papel.....	37
Figura 6 - Ciclo de vida dos fagos filamentosos.....	40
Figura 7 - <i>Biopanning</i>	41
Figura 8 - <i>Biopanning</i> no <i>T. cruzi</i>	52
Figura 9 - Efeito do H ₂ O ₂ na amastigogênese <i>in vitro</i>	56
Figura 10 - Efeito de antioxidantes na amastigogênese <i>in vitro</i>	58
Figura 11 - PegCatalase reverte a ação do H ₂ O ₂ na diferenciação.....	59
Figura 12 - Envolvimento de PP2A na amastigogênese induzida por H ₂ O ₂	61
Figura 13 - Produção de ROS estimulada pelo pH ácido.....	63
Figura 14 - Expressão de Fe-SODA e Fe-SODB durante a amastigogênese.....	65
Figura 15 - Respiração celular de formas tripomastigotas.....	67
Figura 16 - Redução do consumo de O ₂ durante a amastigogênese.....	68
Figura 17 - Titulação de TMRM.....	70
Figura 18 - Efeito de ciclosporina e mitoTEMPO na produção de H ₂ O ₂	71
Figura 19 - Estrutura 3D dos peptídeos N3 e <i>scramble</i>	75
Figura 20 - Ligação do peptídeo N3 no <i>T. cruzi</i> e em células Vero.....	76
Figura 21 - Análise da ligação do peptídeo N3 em formas tripomastigotas por microscopia de fluorescência.....	77
Figura 22 - N3 reduz a invasão de tripomastigotas em células Vero.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de oligonucleotídeos utilizados na qPCR.....	48
Tabela 2 - Sequência de aminoácidos.....	52
Tabela 3 - Potencial de membrana mitocondrial (F_{TMRM}/F_{FCCP}).....	70
Tabela 4 - Sequenciamento dos fagos experimento 1	73
Tabela 5 - Sequenciamento dos fagos do experimento 2	73
Tabela 6 - Sequenciamento dos fagos com alta afinidade.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
ADP	Adenosina difosfato
AMPK α 1	Cinase α 1 ativada por AMP
ATP	Adenosina trifosfato
CAMKII	Proteína cinase dependente de Ca ²⁺ /calmodulina II
CFSE	Éster succinimidílico de carboxifluoresceína
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dsDNA	Fita dupla de DNA
DTU	Unidades discretas de tipagem
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
ERK	Cinases reguladas por sinal extracelular 1/2
ETS	Sistema de transferência de elétrons
FCCP	Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
Fe-SOD	Ferro superóxido dismutase
GAPDH	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
GOE	Grande evento de oxidação
GPI	Glicofosfatidilinositol
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IF	Sítio Flavina
IQ	Sítio de ligação à ubiquinona
MAPK	Proteína cinase ativada por mitogeno
mitoTEMPO	(2-(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-ylamino)-2-oxoethyl)triphenylphosphonium chloride
mPTP	Poros de permeabilidade transitória mitocondrial

mRNA	Acido ribonucleico mensageiro
NAC	N-acetilcisteína
NAD ⁺	Nicotinamida/adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	Nicotinamida/adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	Nicotinamida/adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NFκB	Fator nuclear kappa
Nox	NADPH oxidase
OKA	Ácido ocadáico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAHO	<i>Pan American Health Organization</i>
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Poliétileno glicol
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinase
PIP ₃	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PI-PLC	Fosfolipase C específica para fosfatidilinositol
PKR2	Receptor procinectina-2
PP2A	Proteína fosfatase 2A
PTEN	Homólogo da fosfatase tensina
Q	Ubiquinona
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa
RBOH	Homólogo da oxidase explosão respiratória
RNA	Acido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
ROX	Consumo residual de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
ssDNA	Fita dupla de DNA
Tc-TOX	Proteína reativa cruzada C9
Th-1	<i>T helper 1</i>
TMRM	Éster metílico de tetrametilrodamina
Tup	Peptídeos não relacionados ao alvo
VSG	Glicoproteína variante de superfície

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
1.1 Doença de Chagas.....	16
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.2.1 Taxonomia.....	21
1.2.2 Ciclo biológico.....	23
1.3 Mecanismos de invasão celular pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
1.4 Amastigogênese: a primeira diferenciação intracelular do <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
1.5 Espécies reativas de oxigênio	30
1.6 Defesa antioxidante.....	32
1.7 H ₂ O ₂ como sinalizador	34
1.8 Proteína fosfatase 2A (PP2A)	37
1.9 <i>Phage display</i> : uma poderosa ferramenta para descoberta de ligantes.....	38
1.10 Pesquisa para tratamento da doença de Chagas	42
2 OBJETIVOS.....	44
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	44
3 METODOLOGIA.....	45
3.1 Cultura de células de mamífero	45
3.2 Obtenção de formas tripomastigotas de cultura	45
3.3 Amastigogênese <i>in vitro</i>	45
3.4 Quantificação da expressão de Ssp4 por citometria de fluxo.....	46
3.5 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	46
3.6 Expressão gênica das superóxidos dismutases dependentes de ferro do <i>T. cruzi</i>	47
3.7 Respirometria de alta resolução.....	49
3.8 Potencial de membrana mitocondrial.....	49
3.9 Atividade da proteína fosfatase 2A (PP2A)	50
3.10 Seleção de fagos (<i>biopanning</i>)	51
3.11 Síntese do peptídeo N3	52
3.12 Ensaio de ligação do peptídeo N3.....	53
3.13 Invasão de células Vero por <i>T. cruzi</i>	53

4	RESULTADOS	55
4.1	H₂O₂ acelera a diferenciação de formas tripomastigotas para amastigotas	55
4.2	Peg-catalase: único antioxidante que reverteu totalmente o efeito do H₂O₂ na amastigogênese	57
4.3	PP2A participa da indução da amastigogênese pelo H₂O₂	60
4.4	O estímulo à amastigogênese pelo pH ácido induz a produção de ROS	61
4.5	A indução da amastigogênese por pH ácido modula a expressão de Fe-SODA	64
4.6	Modulação da fisiologia mitocondrial durante a diferenciação <i>in vitro</i>	65
4.7	O peptídeo N3 foi o mais expresso entre os fagos que obtiveram afinidade com as formas tripomastigotas	71
4.8	N3 se liga especificamente as formas que infectam o hospedeiro vertebrado	74
4.9	N3 reduz a invasão em células Vero	78
5	DISCUSSÃO	80
	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	90
	APÊNDICE A - Artigo publicado	113
	APÊNDICE B - Artigo publicado	120

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), existem oito milhões de pessoas infectadas no mundo, sendo a maioria dos casos na América Latina, região endêmica da doença de Chagas (WHO, 2019). Atualmente, o tratamento da doença é baseado em apenas duas drogas descobertas há mais de 30 anos: o benznidazol (Rochagan[®], Rodanil[®], Roche) e o nifurtimox (Lampit[®], Bayer). No entanto, ambos os fármacos causam diversas reações adversas e apresentam baixa eficácia na fase crônica da doença (Colantonio *et al.*, 2016). O nifurtimox apresenta os efeitos mais agressivos e não é mais utilizado no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai (Pérez-Molina e Molina, 2018). Nesse contexto, a descoberta de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas ainda se faz necessário.

As formas infectivas clássicas *T. cruzi* são as tripomastigotas, que são capazes de invadir a célula do hospedeiro vertebrado. Após a invasão na célula do vertebrado, as formas tripomastigotas se diferenciam para as formas amastigotas (processo denominado amastigogênese), que são formas capazes de proliferar e expandir a infecção intracelular no hospedeiro vertebrado (Lidani *et al* 2017). Sendo assim, as etapas de invasão intracelular e amastigogênese são essenciais para o estabelecimento do parasito, sendo alvos de pesquisa para desenvolvimento de drogas. Podemos destacar duas abordagens diferentes para o desenvolvimento de novos fármacos: a fenotípica e a baseada em alvo. Nesse trabalho foi utilizada a abordagem baseada em alvo, sendo empregadas duas diferentes estratégias. Na primeira visamos estudar a relação entre o parasito e a célula hospedeira. Para isso, estudamos o papel das espécies reativas de oxigênio (ROS), mais especificamente o H₂O₂, na diferenciação de formas tripomastigotas para as formas amastigotas. A segunda estratégia consistiu no uso da técnica de *phage display* nas formas infectantes tripomastigotas. Para este fim, foi utilizado uma biblioteca de fagos para seleção de peptídeos específicos para a superfície de *T. cruzi* com capacidade de inibir a invasão do parasito na célula do hospedeiro vertebrado.

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. Doença de Chagas

Em 1909, o pesquisador e sanitarista Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (Carlos Chagas) descreveu uma nova tripanossomíase americana, hoje designada como doença de Chagas. A descoberta ocorreu durante a campanha antimalária em Lassance (Minas Gerais) em 1907, ao investigar um inseto hematófago, conhecido entre os moradores da região como barbeiro. Este trabalho tornou-se um marco na ciência brasileira, uma vez que Chagas não apenas descreveu o vetor, como também o patógeno e os aspectos epidemiológicos e clínicos da doença. Em homenagem ao seu mestre, o pesquisador Oswaldo Cruz, o parasito causador da doença foi nomeado como *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909; revisto por Pérez-Molina e Molina, 2018).

A transmissão da doença Chagas não é exclusivamente vetorial, uma vez que a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* pode ocorrer por outras vias. Dentre as vias de infecção destacam-se: i) vertical ou congênita, ii) oral, iii) transfusão sanguínea, iv) transplante de órgãos e v) exposição acidental no laboratório (Martins-Melo *et al.*, 2012).

A transmissão vetorial ocorre pelos insetos vetores da doença, que são reservatórios do *T. cruzi* e pertencem à família Reduviidae e subfamília Triatominae, conhecidos popularmente como barbeiros. Durante o repasto sanguíneo os insetos defecam próximo ao sítio da picada e os parasitos presentes nas fezes são levados a corrente sanguínea com a ajuda do hospedeiro vertebrado (transmissão estercoreária) (Nouvellet *et al.*, 2013; Rassi *et al.*, 2012). Uma vez que a transmissão vetorial é uma das principais causas de infecção em humanos, uma das formas de combater a doença é o controle dos vetores. No Brasil foi erradicada a transmissão pelo *Triatoma infestans*, o principal vetor no país. Em reconhecimento, foi emitido um certificado internacional de eliminação da transmissão da doença de Chagas por esta espécie pela *Pan American Health Organization* (PAHO, 2006). No entanto, essa certificação pode criar a ilusão do fim da transmissão vetorial, desconsiderando a transmissão por outras espécies além do *Triatoma infestans* (Abad-Franch *et al.*, 2013). Dentre estas espécies, pode-se destacar: i) *Triatoma brasiliensis* no nordeste (Costa, 2000) e ii) *Triatoma pseudomaculata* no cerrado e na caatinga brasileira (Carbajal de la Fuente *et al.*, 2009). Além dessas espécies, um estudo realizado entre os anos de 2008 e

2013 encontrou o *Triatoma sordida* como um possível transmissor da doença no sudeste da Bahia (Silveira *et al.*, 2016). Além de existir outras espécies transmissoras, mudanças da distribuição geográfica de alguns vetores podem alterar o perfil de espécies locais (Abad-Franch e Monteiro, 2007; Medone *et al.*, 2015). Desta forma, estudos epidemiológicos e de dinâmica populacional dos vetores são importantes para aperfeiçoamento de programas de controles de vetores.

A transmissão vertical ou congênita ocorre quando a mulher transmite o *T. cruzi* para seu filho durante a gravidez, através da placenta ou durante o parto. Cerca de 5% dos casos de mulheres infectadas cronicamente na Bolívia, Chile e Paraguai transmitem a doença para seus filhos, diferente do que é observado em outros países, com o índice em torno de 1 a 2% ou menor (revisado por Rassi *et al.*, 2010).. A doença de Chagas congênita pode causar partos prematuros, nascimentos de crianças com pouco peso corporal ou mortas. Os recém-nascidos podem desenvolver hepatoesplenomegalia, meningoencefalite, miocardite, anasarca (edema generalizado em todo corpo) ou anemia (Cardoso *et al.*, 2012).

A transmissão oral acontece pela ingestão de alimentos contaminados com o *T. cruzi*. Esta via apresenta maior mortalidade, variando de 8% a 35%, enquanto que a transmissão clássica, vetorial, apresenta mortalidade de 5 a 10%. Além disso, está associado com a morbidade, aumentando a prevalência e a gravidade de miocardites (revisado por Barreto de Albuquerque *et al.*, 2018). A transmissão oral da doença de Chagas tem ganhado destaque atualmente, principalmente pela redução da via vetorial, no entanto essa rota já tinha sido considerada por Carlos Chagas, em 1909, e demonstrada por outros pesquisadores posteriormente em camundongos. A região amazônica do Brasil é considerada uma área endêmica e a transmissão é preocupante, uma vez que essa região representou 50% dos casos de transmissão entre 1968 e 2000 (Coura *et al.*, 2002; Coura, 2018). A transmissão oral tem causado surtos de infecção em diferentes locais. Em 2005, três pessoas morreram em Santa Catarina, enquanto que, em 2007, na Venezuela ocorreu o maior surto de infecção oral pelo *T. cruzi* já conhecido até hoje. Neste surto, 103 pessoas de uma comunidade escolar, de classe média e saudável, foram contaminadas através da ingestão de suco de goiaba. Infelizmente, uma criança de cinco anos morreu (Andrade *et al.*, 2011; Noya *et al.*, 2010).

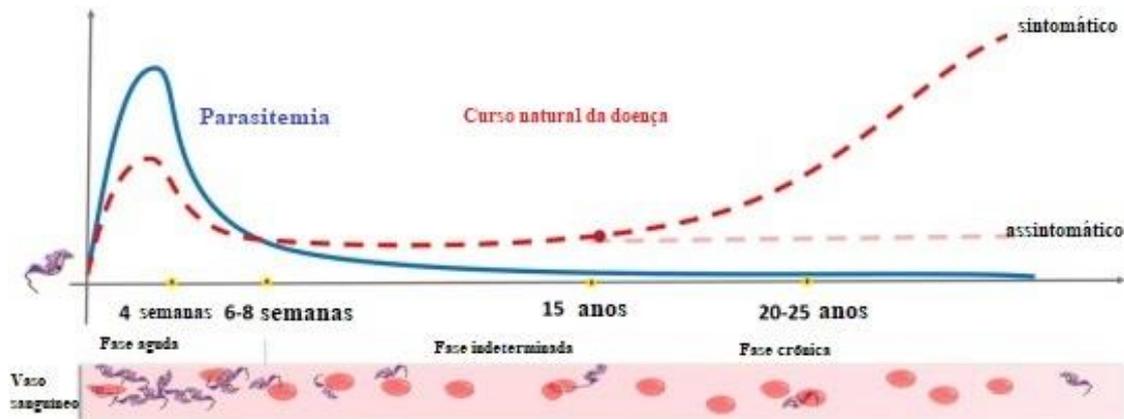
A transmissão por transfusão sanguínea é provavelmente a segunda forma mais frequente de infecção. No Brasil, estima-se que em 1970, 100.000 novos casos da doença foram causados por transfusão de sangue. Em países não endêmicos a transmissão por transfusão de sangue tem papel de destaque, sendo uma das principais causas da globalização da doença. Destaca-se ainda que a transfusão de plaquetas tem maior risco de transmissão,

uma vez que concentra o maior número de tripomastigotas (Coura *et al.*, 2014; Rassi *et al.*, 2012).

A transmissão acidental é menos frequente e ocorre principalmente em laboratórios de pesquisa que trabalham com o *T. cruzi*. Em 2009, foi reportado um caso de uma experiente técnica que negligenciou um acidente de autoinoculação com o parasito, e foi diagnosticada apenas 21 dias após o acidente. Este estudo reforça a importância de adoção de práticas seguras de manipulação laboratorial e a seriedade de um acidente, aparentemente sem consequências (Herwaldt, 2001; Kinoshita-Yanaga *et al.*, 2009).

A doença de Chagas humana apresenta duas fases de acordo com o tempo e nível de parasitos no sangue: aguda e crônica (figura 1) (Pérez-Molina e Molina, 2018).

Figura 1 - História natural da doença de Chagas



Fonte: De Bona *et al.*, 2018.

A fase aguda é o estágio clínico inicial curto, 4 a 8 semanas, normalmente é assintomática. Alguns indivíduos, porém, podem apresentar sintomas e sinais inespecíficos, como lesões inflamatórias no sítio de entrada do parasito (chagoma), mal-estar e febre. Com alta carga parasitária no sangue, nesta fase o parasito pode ser detectado no sangue fresco por exame direto em microscópio ou em análises da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*). Além disso, exames tradicionais de hemocultura ou xenodiagnóstico (exame realizado com os vetores) podem ser realizados. Poucos casos nessa fase desenvolvem-se para óbito, quando acontece normalmente é por miocardite severa e meningoencefalites, sendo as crianças com maior risco de mortalidade (revisado por Chatelain, 2015; Pérez-Molina e Molina, 2018).

A fase crônica corresponde ao tempo tardio da infecção, um longo período de tempo após a exposição ao parasito e podendo persistir por décadas. Apresenta-se em quatro formas diferentes: indeterminada, cardíaca, digestiva e cardio-digestiva (de la Rosa *et al.*, 2018).

Na forma indeterminada da doença de Chagas, os indivíduos possuem anticorpos contra o *T. cruzi*, porém não apresentam sinais clínicos e sintomas da doença. Esta fase pode durar de 10 a 30 anos, dificultando o diagnóstico da doença. No entanto esses indivíduos podem transmitir a doença e, portanto, podem contribuir para a sua dissiminação durante a gravidez e através da transfusão sanguínea. Considerando esses aspectos, tem-se estudado formas de diagnósticos eficientes para esta fase (Barros *et al.*, 2001; de la Rosa *et al.*, 2018; Noya-Rabelo *et al.*, 2018).

Cerca de 25-30% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma grave cardíaca, e enquanto 30 a 40% dos indivíduos que apresentam a fase indeterminada podem desenvolver as complicações cardíacas. Esses indivíduos que manifestam os sintomas cardíacos apresentam uma mudança visível tanto na forma quanto no tamanho do coração. Além disso, é possível observar lesões teciduais (fibrose) promovidas por uma intensa resposta inflamatória. Com isso, a função cardíaca é comprometida nesses indivíduos e em casos mais graves levando ao transplante de coração (Bonney *et al.*, 2018).

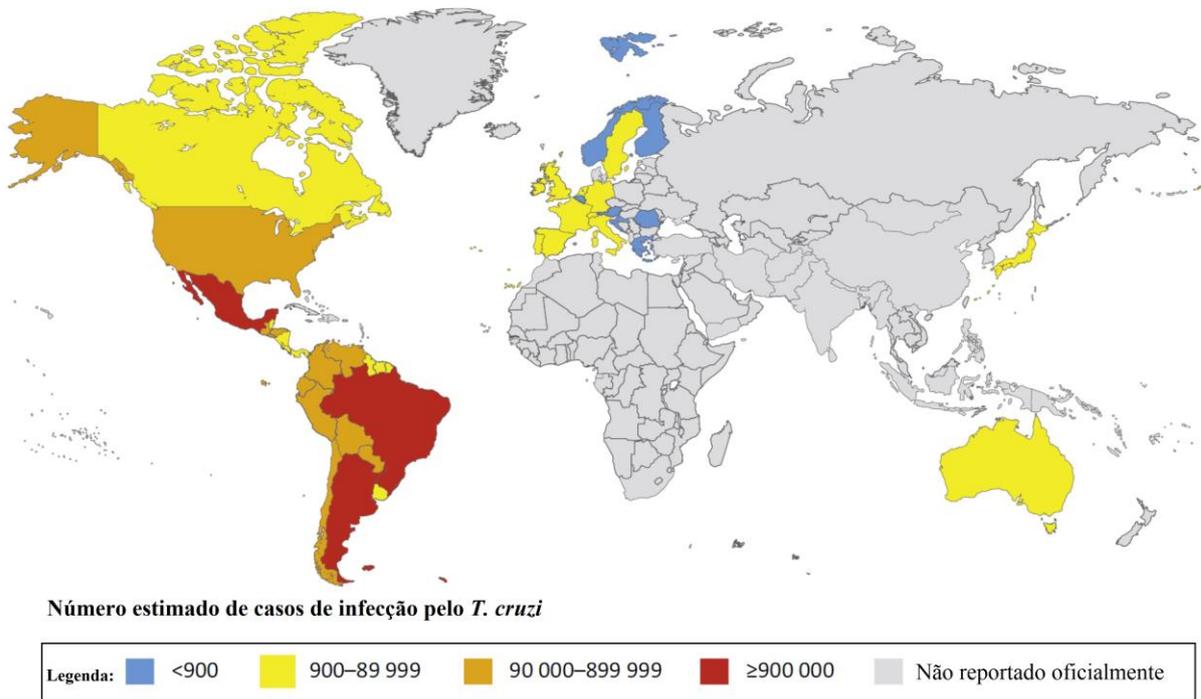
Na forma digestiva da doença de Chagas ocorre uma intensa inflamação crônica, tendo como consequência a destruição de neurônios entéricos. Os indivíduos apresentam alargamento progressivo do esôfago (megaesôfago), do cólon sigmóide ou reto (megacólon) (revisto por Chatelain, 2015; Jabari *et al.*, 2014).

Atualmente a doença de Chagas afeta aproximadamente seis milhões de pessoas, um número expressivamente menor que na década de 90, onde a doença afetava entre 15 e 30 milhões de indivíduos. Essa redução é resultado de programas de saúde pública, como por exemplo, controle vetorial e de bancos de sangue. Contudo, é importante salientar que a doença apresenta uma incidência anual de 30 mil casos nas Américas e de 14 mil mortes, e que os índices de insuficiência cardíaca devido a doença de Chagas não foram reduzidos. Além disso, cerca de 70 milhões de pessoas vivem em áreas de exposição nas Américas, com risco de contrair a parasitose (GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2016; PAHO, 2017).

Classificada como uma doença negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença de Chagas era exclusiva de áreas endêmicas, onde se encontra o inseto vetor, em regiões das Américas com baixo desenvolvimento social e econômico. Atualmente a doença de Chagas é globalizada, com notificação de pessoas infectadas em regiões não

endêmicas. A região de fronteira do Texas, nos Estados Unidos, com o México apresenta historicamente alta prevalência da doença de Chagas e, no entanto, a ausência de notificação da morbidade é alta. Estudos recentes mostram a importância de realizar uma triagem da doença na população de países não endêmicos (Coura e Viñas, 2010; Nolan *et al.*, 2018; Salvador *et al.*, 2018). Na figura 2 observa-se a distribuição geográfica da doença de Chagas.

Figura 2 - Distribuição global da doença de Chagas (2006-2010)



TRENDS in Parasitology

Fonte: Perez *et al.*, 2015.

O tratamento para a doença de Chagas está limitado aos fármacos nitroheterocíclicos: o benznidazol (Rochagan[®] e Radanil[®]/Roche, LAFEPE Benznidazol[®]/ LAFEPE [Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco], Abarax[®]/ELEA) e o nifurtimox (Lampit[®], Bayer). Acredita-se que a ação tripanocida do benznidazol seja através de compostos intermediários gerados após o fármaco se reduzido por nitrorredutases (Hall e Wilkinson, 2012). Apesar do nifurtimox também ser reduzido por nitrorredutases, a sua ação tripanocida ocorre pela produção de espécies reativas de oxigênio, que induzem o estresse oxidativo. Considerando que ambos os fármacos, benznidazol e nifurtimox, sofrem ação de nitroreductases, a variação da expressão dessas enzimas influencia diretamente a susceptibilidade do *T. cruzi* à droga (Barrett e Croft, 2012).

O perfil de segurança e eficácia, tanto do nifurtimox quanto do benznidazol está longe do ideal. As eficácias desses fármacos estão relacionadas com o tempo de infecção com o parasito. A frequência de efeitos colaterais no tratamento com nifurtimox é alta, variando entre 43 e 97,5%. Dentre os mais comuns destaca-se a anorexia e desordens neurológicas. O benznidazol apresenta maior tolerabilidade, com índice de descontinuação em torno de 9 a 29% contra 14,5 a 75% do nifurtimox. Esta diferença pode ser devida ao benznidazol apresentar menos efeitos colaterais graves. Portanto, o uso de benznidazol é geralmente preposto ao nifurtimox, sendo até mesmo única opção de tratamento em alguns países como o Brasil e Argentina (Pérez-Molina e Molina, 2018; Wilkinson *et al.*, 2011).

Uma vez que o benznidazol apresenta eficácia limitada na fase crônica, tem-se buscado novas posologias e combinações com outras drogas para tratamento nesta fase (Colantonio *et al.*, 2016; Morillo *et al.*, 2015).

As combinações mais promissoras seriam com azóis antifúngicos, o posaconazol (Chagazol) e o ravuconazol (E1224). Ambos os candidatos foram altamente potentes contra o *T. cruzi* em estudos *in vitro* e em modelo animal além de apresentarem efeitos colaterais mais seguros que o benznidazol. Considerando esses aspectos, os anti fúngicos foram usados para ensaios clínicos com pacientes chagásicos crônicos. O posaconazol foi tripanostático apenas durante o tratamento, mas ineficiente em longo prazo. A terapia combinada com benznidazol não foi efetiva, sendo similar a monoterapia com benznidazol. Similarmente, o ensaio clínico com ravuconazol não foi capaz de sustentar sozinho o *clearance* do parasito em pacientes portadores da doença de Chagas. Ainda não foi realizado nenhum ensaio clínico usando a terapia combinada do benznidazol e o ravuconazol. No entanto, em modelo murino, a combinação de benznidazol com o ravuconazol foi benéfica, mesmo contra uma cepa resistente à multidrogas (cepa colombiana) (Diniz *et al.*, 2018; Molina *et al.*, 2014; Morillo *et al.*, 2017; Torrico *et al.*, 2018). Neste contexto, o desenvolvimento de novas drogas e estudos de novos regimes de tratamento com benznidazol são necessários.

1.2. *Trypanosoma cruzi*

1.2.1. Taxonomia

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e ao gênero *Trypanosoma*. O parasito tem apenas uma única mitocôndria

que se ramifica por todo corpo. O ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês, *deoxyribonucleic acid*) mitocondrial é organizado em forma de minicírculos e maxicírculos condensados dentro da mitocôndria, formando a estrutura denominada cinetoplasto. A morfologia dessa estrutura difere entre as várias formas do parasito, sendo arredondada nas formas tripomastigotas e em bastão nas formas epimastigotas e amastigotas (Moreira *et al.*, 2004; Shapiro e Englund, 1995; Teixeira *et al.*, 2011). Destaca-se a importância médica da família Trypanosomatidae que, além do *T. cruzi*, possui outras espécies patogênicas, como por exemplo, *Leishmania spp.* e o *Trypanosoma brucei*, que causam respectivamente a Leishmaniose e a tripanossomíase Africana (de Souza, 2002).

Em 2004, Moreira e colaboradores propuseram a revisão taxonômica dos protozoários da ordem Kinetoplastida, através do uso de análise filogenética molecular. Nesta classificação, os protozoários estão agrupados na classe Kinetoplastidae, com duas subclasses (Prokinetoplastina e Metakinetoplastina) e cinco ordens: i) Trypanosomatida, ii) Eubodonida, iii) Parabodonida, iv) Neobodonida e v) Prokinetoplastida (Moreira *et al.*, 2004).

A ordem Trypanosomatida agrupa protozoários, cujos cílios ou flagelos emergem de uma bolsa ciliar ou flagelar localizada na região anterior ou lateral do corpo do parasito, podendo estes cílios ou flagelos ainda estar ligados à membrana plasmática, formando a membrana ondulante. Os tripanossomatídeos apresentam o cinetoplasto localizado próximo à base do flagelo. Os protozoários desta ordem podem tanto apresentar um (monoxênico) ou mais hospedeiros ao longo do ciclo de vida (heteroxênico). Os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* apresentam parasitos heteroxênicos de vertebrados, enquanto que o gênero *Phytomonas* apresenta parasitos heteroxênicos de plantas. Os gêneros *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas* e *Wallaceina* compreendem os parasitos monoxênicos da ordem Trypanosomatida (Adl *et al.*, 2012).

Em 2009, uma nomenclatura intraespecífica do *T. cruzi* foi proposta à comunidade científica. Baseado na variabilidade genética e eco-epidemiologia, foram estabelecidos seis grupos conhecidos como *Discrete Typing Units* (DTU) e nomeados de TcI até TcVI (Zingales *et al.*, 2009; Zingales *et al.*, 2012). Posteriormente foi reconhecido Tcbat como um novo DTU (Lima *et al.*, 2015)

1.2.2. Ciclo biológico

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo, heteroxênico, alternando entre dois hospedeiros diferentes: vertebrados e invertebrados.

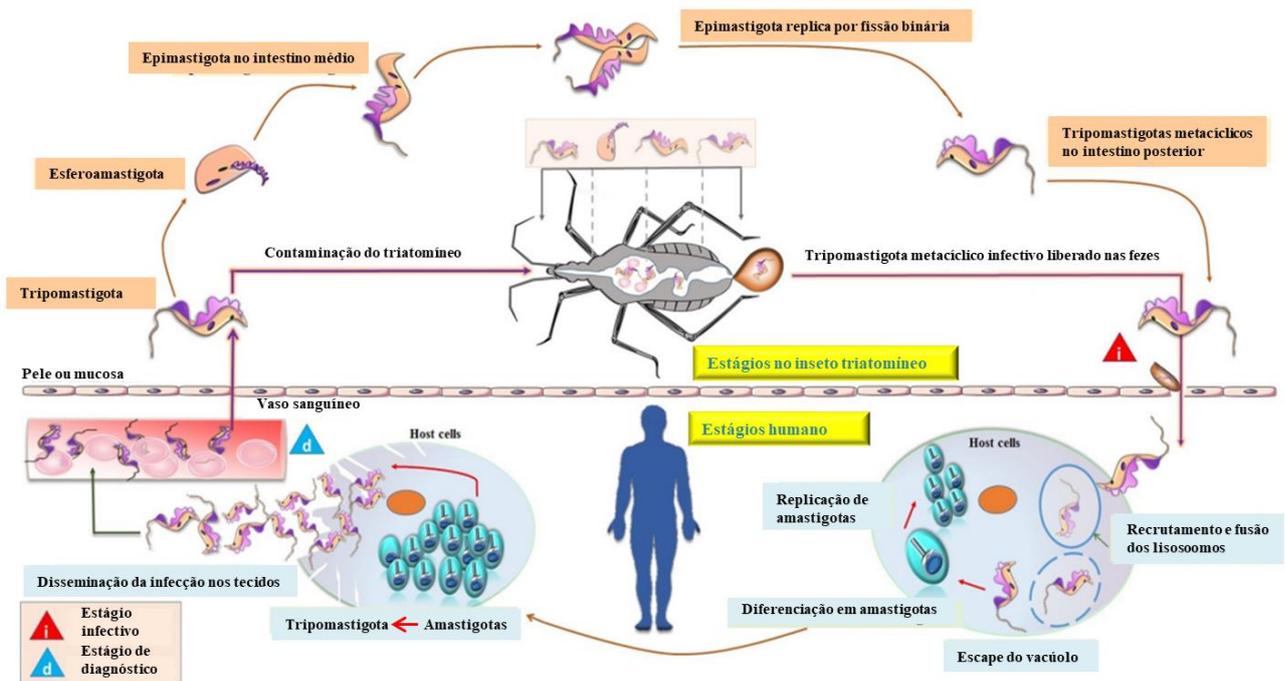
Destaca-se ainda a grande variabilidade morfológica e bioquímica entre os diferentes estágios do parasito ao longo do ciclo de vida. Existem três principais estágios de desenvolvimento do *T. cruzi*: (i) epimastigotas, (ii) tripomastigotas e (iii) amastigotas. Além dessas, há outras duas formas intermediárias, as esferomastigotas e *epimastigotas-like*. (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999; Lidani *et al.*, 2017).

Os triatomíneos são infectados durante o repasto sanguíneo ao ingerir formas tripomastigotas presentes no sangue dos hospedeiros vertebrados infectados. Ao chegar à região anterior do intestino médio, as formas tripomastigotas sanguíneas se diferenciam em formas epimastigotas ou esferomastigota. No intestino médio as formas epimastigotas replicam e aderem na membrana perimicrovilar das células intestinais do triatomíneo. Na região posterior e no reto, onde a disponibilidade de nutrientes é escassa, muitos epimastigotas soltam da superfície intestinal, diferenciam-se em formas infectantes e não replicativas conhecidas como tripomastigotas metacíclicas. Tais formas são liberadas nas fezes durante a alimentação. No entanto, a forma tripomastigota não penetra na pele íntegra, sendo necessário o hospedeiro vertebrado coçar ou esfregar para então carrear o parasito para o sítio da picada (Lidani *et al.*, 2017).

Uma vez na corrente sanguínea, os tripomastigotas invadem as células do hospedeiro vertebrado. Para a continuidade da infecção intracelular do *T. cruzi* na célula hospedeira, as formas tripomastigotas escapam do fagolisossomo para o citosol, onde se diferenciam para as formas replicativas amastigotas. Esse escape ocorre pela lise/desintegração da membrana do vacúolo parasitóforo. As formas tripomastigotas liberam no vacúolo a transialidase, que remove os ácidos siálicos da membrana do fagolisossomo permitindo a ação da proteína reativa cruzada C9 (Tc-TOX, do inglês, *C9 cross-reactive protein*). O pH ácido do vacúolo parasitóforo é essencial para ativação da Tc-TOX. A proteína LYT1, assim como a Tc-TOX, apresenta atividade hemolítica participando também da lise da membrana do fagolisossomo. Ambas as proteínas atuam na formação de pequenos poros que levam a fragmentação dessa membrana (Andrews *et al.*, 1990; Hall *et al.*, 1992; Ley *et al.*, 1990; Manning-Cela *et al.*; 2001; Rubin-de-Celis *et al.*, 2006).

No citoplasma, as formas tripomastigotas se diferenciam nas formas amastigotas. Este processo será discutido mais detalhadamente posteriormente. As formas evolutivas amastigotas multiplicam-se por divisão binária. Antes da diferenciação para a forma tripomastigota, identificam-se formas intermediárias, epimastigota-like, que são dependentes de L-prolina para completar a diferenciação intracelular (Tonelli *et al.*, 2004). Ao romper a membrana plasmática celular, as formas tripomastigotas são liberadas na corrente sanguínea espalhando a infecção no hospedeiro ou podem ser sugadas pelo inseto triatomíneo, infectando-os (Coura, 2008; Rassi *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2010). O ciclo do *T. cruzi* pode ser observado na figura 3.

Figura 3 - Ciclo biológico de *T. cruzi*.



Fonte: adaptado de Lidani *et al.*, 2017.

1.3. Mecanismos de invasão celular pelo *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um parasito intracelular obrigatório, com isso a capacidade de invadir a célula do hospedeiro é essencial para progressão do seu ciclo evolutivo. As formas infectantes tripomastigotas apresentam diferentes mecanismos de entrada na célula hospedeira (Barrias *et al.*, 2010).

Em células não fagocíticas, a entrada do parasito pode ocorrer através da invaginação da membrana, formando o vacúolo intracelular que é posteriormente fusionado com os lisossomos (Rodríguez *et al.*, 1999). Além disso, o parasito pode ativar as vias de sinalização de cálcio, que irá promover o recrutamento de lisossomos para o sítio de entrada do parasito, facilitando sua entrada. O recrutamento dos lisossomos pode ser induzido pelas formas tripomastigotas através da injúria à membrana plasmática da célula hospedeira. Esse processo leva à ativação das vias de reparo mobilizando cálcio intracelular, induzindo a exocitose de lisossomos para a região (Albertti *et al.*, 2010; McNeil e Steinhardt, 2003; Reddy *et al.*, 2001).

Tem sido descrito quatro mecanismos principais de entrada do *T. cruzi* em células hospedeiras, são eles: (1) dependente de lisossomo, (2) independente de lisossomo, (3) autofágico e (4) fagocitose.

Em 1992, Tardieux e colaboradores observaram pela primeira vez o recrutamento de lisossomos durante a invasão de tripomastigotas (Tardieux *et al.*, 1992). A exocitose dos lisossomos para o sítio de entrada é induzida pelo *T. cruzi* através de danos à membrana da célula do hospedeiro. Esse dano pode ser provocado mecanicamente por formas tripomastigotas fortemente aderidas à membrana através de sua movimentação. A fusão dos lisossomos com a membrana danificada, onde o parasito encontra-se aderido, causa a liberação de esfingomielinase que cliva a esfingomielina da membrana e gera ceramida. Esse lípido induz a endocitose da membrana danificada, e o parasito é internalizado juntamente com o endossoma. (Fernandes *et al.*, 2011). No entanto, o Ca^{+2} tem um papel fundamental na sinalização desse processo, uma vez que o mesmo requer a participação de sinaptotagmina VI e Ca^{+2} calmodulina, ambas dependentes do íon (Caler *et al.*, 2001; Chakrabarti *et al.*, 2005).

Para o *T. cruzi* invadir as células independente do recrutamento dos lisossomos, a ativação de fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K) é essencial. O parasito entra através de invaginações de membrana contendo fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃). Além disso, a dinamina associada a PI3K pode estar envolvida no processo de formação do vacúolo

parasitóforo (Barrias *et al.*, 2010; Todorov *et al.*, 2000; Wilkowsky *et al.*, 2001; Woolsey *et al.*, 2003). Embora a entrada seja independente do recrutamento de lisossomos, esta é reversível e os parasitos podem escapar da célula do hospedeiro. Para impedir essa reversão, a fusão desses vacúolos com os lisossomos é uma etapa chave para o sucesso da infecção intracelular (Andrade e Andrews, 2004).

O terceiro mecanismo envolve a ativação da via autofagocítica pelo *T. cruzi*. Essa via participa da regulação do desenvolvimento, da resposta ao estresse nutricional e do *clearance* de proteínas e organelas danificadas. Durante o processo de autofagia, membranas intracelulares envolvem organelas e restos citoplasmáticos, podendo englobar também microrganismos em fagossomos, neste caso chamados de autofagossomos (Glick *et al.*, 2010). A fusão do vacúolo autofagocítico contendo o *T. cruzi* com os lisossomos forma o autofagolisossomo, que é rico em nutrientes, como as poliaminas, essenciais para o parasito (Barclay *et al.*, 2011).

Em macrófagos, tanto formas amastigotas quanto formas tripomastigotas podem entrar através da fagocitose. A fagocitose é dependente dos microfilamentos de actina em que sua polimerização é essencial para a invasão. Além disso, a integridade de *rafts* na membrana são importantes. *Rafts* são microdomínios lipídicos compostos por colesterol, gangliosídeos, flotilina e caveolinas (Barrias *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2007; Hissa *et al.*, 2012). A galectina-3, uma proteína presente nos macrófagos, e glicoproteínas de superfície do parasito, especialmente o ácido siálico também participam do processo de fagocitose do *T. cruzi*. (Lieke *et al.*, 2011; Reignault *et al.* 2014).

O *T. cruzi* apresenta moléculas de superfícies que estão envolvidas em um ou mais mecanismos de invasão pelo parasito na célula. Essas moléculas são secretadas ou estão na membrana do parasito. As principais podem ser agrupadas em glicoproteínas ou proteases (Campos *et al.*, 2016).

As glicoproteínas que pertencem a superfamília da GP85/transialidase são ancoradas em glicosilfosfatidilinositol com massa molecular entre 85 e 90 kilodaltons. Essas glicoproteínas são capazes de catalisar a transferência de ácido siálico do hospedeiro para a superfície do parasito e interagem com diversos ligantes da matriz extracelular, tais como, laminina, fibronectina, colágeno entre outros (Tonelli *et al.*, 2010). A Gp82 é o principal membro dessa superfamília, envolvida na internalização de tripomastigotas metacíclicos, e induz vias de sinalização que levam a liberação de Ca^{+2} . Essa glicoproteína também é crucial para infecção oral do *T. cruzi*, uma vez que participa da invasão do epitélio gástrico pelos tripomastigotas (Alves e Colli, 2010; Yoshida, 2008).

Uma das principais proteases envolvidas na invasão é a cruzipaina. Essa cisteína protease degrada proteínas da matriz extracelular, sendo essencial para o *T. cruzi*. Essa enzima apresenta um papel importante não somente na invasão mas em outros processos celulares como, crescimento do parasito e a defesa contra o sistema imune do hospedeiro (Cazorla *et al.*, 2010). A cruzipaina induz a arginase, uma enzima que compete com a óxido nítrico sintase (iNOS) pelo substrato L-arginina, reduzindo indiretamente a produção de óxido nítrico (NO), um microbicida que contribui para a morte do parasito e sobrevivência do hospedeiro. Além disso, a arginase participa da síntese de poliaminas, que são fundamentais para o crescimento e sobrevivência do *T. cruzi*, participando da síntese de tripanotona, uma molécula importante para a defesa antioxidante do parasito (Dulgerian *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2014). A cruzipaina é um dos principais alvos quimioterápicos estudados, a descoberta de novos inibidores e seu potencial terapêutico tem sido amplamente discutida a literatura (Ndao *et al.*, 2014; Salas-Sarduy *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2018; Sbaraglini *et al.*, 2016). Portanto, o desenvolvimento de novas drogas ainda é necessário.

Embora as formas tripomastigotas sejam classicamente caracterizadas como formas infectantes do *T. cruzi*, outras formas evolutivas são capazes de infectar o hospedeiro vertebrado. Em 2017, Kessler e colaboradores demonstraram a capacidade para infecção de formas epimastigotas recém diferenciadas de tripomastigotas (Kessler *et al.*, 2017) Formas amastigotas extracelulares podem ser obtidas espontaneamente em cocultura de *T. cruzi* - hospedeiro ou induzidas à diferenciação por pH ácido (Takagi *et al.*, 2019). Tem sido descrita a habilidade dessas formas induzirem a fagocitose em células hospedeiras. A internalização das formas amastigotas extracelulares são dependentes dos microfilamentos de actina. Sendo assim, a inibição da polimerização da actina inibe drasticamente a invasão celular pelos amastigotas extracelulares (Fernandes *et al.*, 2013; Procópio *et al.*, 1998).

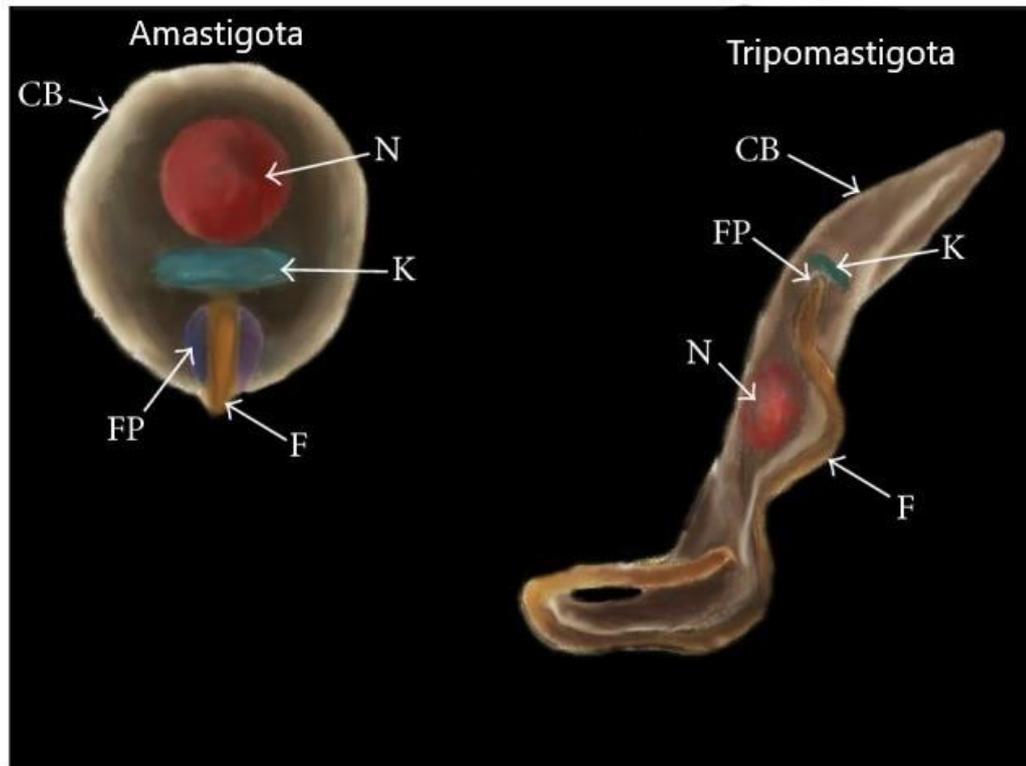
1.4. Amastigogênese: a primeira diferenciação intracelular do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um parasito intracelular obrigatório, em que a invasão e permanência nas células do hospedeiro vertebrado são essenciais para sua propagação. Sendo assim, as fases intracelulares do parasito são passos críticos para sua sobrevivência e disseminação no hospedeiro.

Após a entrada na célula hospedeira, ocorre formação do vacúolo parasitóforo. Em seguida, o vacúolo se funde com lisossomos, passo fundamental para sua maturação e posterior escape do parasito para o citosol (Andrade *et al.* Andrews, 2004, Epting *et al.*, 2010). Além disso, o pH ácido promovido pela fusão lisossomal, provoca a perda da motilidade dos parasitos, o que sugere o início da diferenciação das formas tripomastigotas para formas amastigotas (amastigogênese) (Salassa e Romano, 2018). Nesse contexto, são encontrados vários protocolos de amastigogênese *in vitro* induzidas por pH ácido (Hernández-Osorio *et al.*, 2010; Tomlinson *et al.*, 1995).

A diferenciação das formas tripomastigotas para as formas amastigotas envolvem rearranjos morfológicos progressivos e complexos. As formas tripomastigotas possuem aproximadamente 25 μm de comprimento e 2 μm de diâmetro. São formas alongadas, que podem se apresentar de forma mais retilínea ou em formato curvado. O cinetoplasto se encontra subterminal ou posterior ao núcleo, enquanto as formas amastigotas apresentam forma esférica ou oval, e possuem entre 2 e 4 μm . Essa forma possui um flagelo muito curto e o cinetoplasto encontra-se no meio do corpo celular, próximo ao núcleo (de Souza, 2002; Hernández-Osorio *et al.*, 2010). Ambas as formas evolutivas, tripomastigotas e amastigotas, estão representados na figura 4.

Figura 4 - Formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*



Legenda: N- núcleo; K – cinetoplasto; F- flagelo; FP- bolsa flagelar; CB - corpo celular.
 Fonte: Modificado de Pech-Canul *et al.*, 2017

A participação de uma fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) na amastigogênese tem sido bem descrita na literatura. Esta enzima catalisa a hidrólise de fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato para os segundos mensageiros diacilglicerol e inositol 1,4,5 – trifosfato. Em 2000, Furuya e colaboradores observaram que tanto a expressão quanto a atividade da enzima é aumentada durante o processo de diferenciação das formas tripomastigotas para amastigotas. Além disso, neste mesmo trabalho, foi constatado que a enzima está associada à membrana durante a diferenciação. Posteriormente, Okura e colaboradores em 2005, observaram que essa expressão, na membrana, é fundamental para participação da PI-PLC na diferenciação. A superexpressão de PI-PLC nas formas tripomastigotas foi capaz de acelerar a amastigogênese em meio ácido. No entanto, quando os parasitos foram tratados com o oligonucleotídeo antisense da PI-PLC, o processo de diferenciação de formas tripomastigotas para amastigotas foi reduzido. Esses dados corroboram a importância da PI-PLC na transformação das formas tripomastigotas para as formas amastigotas (Furuya *et al.*, 2000; Mortara *et al.*, 2001; Okura *et al.*, 2005).

Outras moléculas de superfície do parasito podem influenciar a amastigogênese. Por exemplo: (i) A inositolfosfoceramida, componente ancorador de glicoinositolfosfolípidos e

(ii) o pequeno antígeno de superfície de tripomastigotas (TSSA) (Cámara *et al.*, 2017; Salto *et al.*, 2003).

1.5. Espécies reativas de oxigênio

Nos primeiros 4,5 bilhões de anos da terra, a concentração de oxigênio terrestre era menor que 0,001%. Atualmente a atmosfera é composta por 21% de oxigênio. No entanto, este processo de transição foi demorado e dinâmico, apresentando flutuações no nível de oxigênio, e somente nos últimos 2,4-2,1 bilhões de anos a atmosfera deixou de ser redutora e passou a ser oxidante. Este processo é conhecido como o grande evento de oxidação (GOE, do inglês great oxidation event) (Lyons *et al.*, 2014).

O GOE ocorreu devido à evolução de organismos capazes de realizar a transdução de energia solar em energia química. Neste processo de fotossíntese ocorre a geração de O₂ como produto da conversão de dióxido de carbono e água em glicose. Cerca de 1,5 bilhões de anos atrás, apareceram os primeiros organismos eucarióticos com mitocôndrias, organelas em que a glicose é oxidada à dióxido de carbono e água. Esse processo gera equivalentes reduzidos que passam pelo complexo respiratório mitocondrial, que resultam num gradiente de prótons que é usado para a síntese de adenosina 5'-trifosfato (ATP). Assim como o estabelecimento da fotossíntese permitiu a evolução de organismos eucariotos, estes contribuíram para o estabelecimento de metazoários, uma vez que as mitocôndrias são altamente eficientes na produção de ATP, uma molécula energética necessária para o desenvolvimento e manutenção de organismos multicelulares complexos. Porém, o uso do O₂ como substrato para produção de energia, gera espécies reativas, que podem ocasionar a morte ou disfunção celular (Semenza, 2007).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas hiper-reativas, oriundas da redução do oxigênio molecular. Podem ser constituídas por radicais livres ou espécies não radicalares. Quando radicais, apresentam um ou mais elétrons desemparelhados, que para obter estabilidade reagem com diversos compostos. Esses, por sua vez, perdem seu elétron e tornam-se radicais livres, desencadeando uma cascata de reações que podem levar ao dano celular (Phaniendra *et al.*, 2015).

Dentre as espécies radicalares, podemos citar o peroxil (ROO[•]), o alcoxil (RO[•]), o ânion superóxido (O₂^{•-}), o hidroxil (•OH), entre outros. Apesar de serem mais estáveis, as

espécies não radicalares podem gerar danos nos organismos vivos, pois participam de reações que levam a formação de radicais livres. São espécies não radicalares: o ácido hipocloroso (HClO), o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), entre outras (Halliwell, 2001; Magder, 2006).

O H_2O_2 é capaz de atravessar membranas biológicas e pode atuar na oxidação de diversas moléculas alvos. Ele pode ser gerado pela dismutação espontânea do $\text{O}_2^{\cdot-}$, ou pela dismutação enzimática através da superóxido dismutase (SOD) (Marinho *et al.*, 2014).

O ânion superóxido é produto da redução de um elétron do oxigênio. O radical pode ser formado através de reações enzimáticas, de auto-oxidação e de transferência de elétrons não enzimática durante a respiração celular.

A mitocôndria é uma das principais fontes de produção do ânion superóxido. Essa organela é capaz de converter a energia contida nos nutrientes em adenosina trifosfato (ATP), que é considerada uma “moeda energética universal” dos sistemas biológicos. Neste processo, ocorre a transferência de elétrons no sistema transportador de elétrons, onde diversos substratos metabólicos são oxidados gerando um potencial de energia que permitirá a fosforilação da adenosina difosfato (ADP) em ATP (Mitchell, 1979, Wang *et al.*, 2010).

Nos mamíferos, a mitocôndria é o compartimento celular com a maior atividade de reações de redução e oxidação (redox). A maioria do oxigênio consumido é reduzida completamente à água, porém uma pequena parcela pode ser parcialmente reduzida, cerca de 0,12 a 2% *in vitro*, gerando ROS (Murphy, 2009). Os complexos I (NADH:ubiquinona oxidoreductase) e III do sistema transportador de elétrons são os principais produtores de $\text{O}_2^{\cdot-}$ durante a respiração celular (West, 2011).

O complexo I oxida o NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) a NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado), reduz a ubiquinona para ubiquinol e bombeia prótons para o espaço intermembrana. Durante esse processo, os elétrons podem escapar e reduzir parcialmente o oxigênio (Brand, 2010; Sazanov *et al.*, 2013). Tem sido descrito a participação de dois sítios de produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ no complexo I, o sítio flavina (IF) e o sítio de ligação à ubiquinona (IQ). Durante a transferência de elétrons *forward*, em que o NADH é oxidado, o sítio IF é o principal centro produtor de $\text{O}_2^{\cdot-}$, no entanto durante a transferência de elétrons *reverse* (NAD^+ é reduzido para NADH), o sítio IQ gera os níveis mais altos deste ânion. A geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ no sítio IF depende da razão de NAD^+/NADH , não sendo afetada pela oxidação de ubiquinona (Q) ou inibidores do sítio IQ. Durante a transferência de elétrons reversa tem-se a redução de NAD^+ , desencadeada pela oxidação de succinato para produzir ubiquinol (fornecimento de elétrons) e por uma substancial força próton motriz, para superar a

diferença de potencial redox desfavorável. Sendo assim, a produção de $O_2^{\bullet-}$ pelo sítio IQ durante a transferência de elétrons reversa depende dos níveis de ubiquinona reduzida e da força próton motriz (Pryde e Hirst, 2011; Treberg *et al.*, 2011)

O complexo III transfere elétrons vindo da coenzima Q para o citocromo C. Este complexo produz $O_2^{\bullet-}$ através da reação do oxigênio com a semiquinona no centro *o* (sítio IIIQo). Somente na presença do inibidor antimicina o complexo III produz altas taxas de $O_2^{\bullet-}$. Uma vez que este inibidor provoca um pequeno acúmulo de semiquinona no centro *o* que leva a redução de oxigênio à $O_2^{\bullet-}$, por bloquear a transferência de elétrons do citocromo b_{566} para quinona no centro *i* (Brand, 2010; Murphy, 2009).

1.6. Defesa antioxidante

Em contrapartida à produção de ROS os organismos desenvolveram um mecanismo de combate às espécies reativas. Esse mecanismo é através da ação de antioxidantes que podem ser definidos como qualquer substância que impede, previne ou remove dano oxidativo para uma molécula alvo. Os antioxidantes podem ser enzimáticos e não enzimáticos. São exemplos de antioxidantes enzimáticos: a SOD, a catalase e glutathione peroxidase (GPx), tioredoxina e a peroxiredoxina (Valko *et al.*, 2006; Gutteridge e Halliwell, 2010).

A SOD é uma enzima que catalisa a dismutação de $O_2^{\bullet-}$ para oxigênio molecular e uma espécie menos reativa, o H_2O_2 . Apesar de ter sido isolada em 1939, somente em 1969 sua atividade antioxidante foi comprovada (McCord e Fridovich, 1969). A enzima apresenta diferentes isoformas que diferem entre si pelo metal no centro de atividade e pela composição de aminoácidos. As principais isoformas são: (i) A ferro superóxido dismutase (Fe-SOD) que requer o metal ferro como cofator e é associada com proteção ao estresse oxidativo de plantas protozoário, (ii) a cobre e zinco superóxido dismutase (Cu-Zn-SOD ou SOD1) que está presente no citosol e no espaço intermembrana na mitocôndria, (iii) a isoforma mitocondrial dependente de manganês (Mn-SOD ou SOD2) e (iv) a superóxido dismutase extracelular (EC-SOD ou SOD3) que é uma glicoproteína secretada para o ambiente extracelular (Miller, 2012; Okutsu *et al.*, 2014; Valko *et al.*, 2006).

O *T. cruzi* contém exclusivamente a SOD dependente de ferro (Fe-SOD). Existem quatro isoformas descritas em tripanossomatídeo: (1) Fe-SODA, (2) Fe-SODB, (3) Fe-SODB2 e a (4) Fe-SODC. A Fe-SODA e Fe-SODC são isoformas mitocondriais enquanto que a Fe-SODB é citosólica e Fe-SODB2 é glicosomal. Assim como ocorre em mamíferos, a

Fe-SOD é capaz de catalisar a dismutação de $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 . A atividade da Fe-SOD está relacionada com a capacidade do parasito de estabelecer a infecção intracelular. Enquanto que a Fe-SOD é inativada por peroxinitro, uma espécie reativa de nitrogênio, a Fe-SODB é resistente. Nesse contexto, apesar da inativação de Fe-SODA durante a infecção intracelular, que pode induzir à morte celular programada do parasito, a Fe-SODB contribui para a resistência do parasito neste ambiente (Dufernez *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2014).

A catalase é uma heme enzima capaz de degradar o H_2O_2 em água e oxigênio, estando localizada nos peroxissomos. A reação pela catalase é feita em dois passos. Inicialmente o componente I é formado através transferência de dois elétrons do heme para o H_2O_2 no sítio ativo. O componente I é o radical oxiferril porfirina, e ele recebe dois elétrons de uma segunda molécula de H_2O_2 para formar água e oxigênio molecular. Observou-se que o H_2O_2 é concentrado no sítio da enzima, o que aumenta a eficiência cinética da mesma (Domínguez *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos podemos citar como exemplo: a glutathiona, o N-acetilcisteína (NAC) e o ácido úrico. O tripeptídeo γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina conhecido principalmente como glutathiona (GSH), é um tripeptídeo fundamental para a homeostase redox celular. O GSH pode reagir diretamente com os radicais livres, reduzindo-os de maneira não enzimática (Aquilano *et al.*, 2014; Zhang e Forman, 2012).

A N-acetilcisteína (NAC) é um potente antioxidante utilizado na medicina como agente mucolítico e no tratamento de diversas doenças, como por exemplo, a intoxicação por paracetamol e metais pesados, a angina *pectoris* estável e desordens respiratórias, entre outras. Sua ação antioxidante está relacionada com o aumento dos níveis celulares de GSH, uma vez que é um precursor acetilado do aminoácido L-cisteína, sendo ainda capaz de reagir diretamente com diferentes ROS, principalmente o $\cdot OH$ (Samuni *et al.*, 2013).

O ácido úrico é um antioxidante endógeno produzido no catabolismo de purinas. A enzima xantina oxidase catalisa a oxidação de hipoxantina em duas reações consecutivas, gerando o ácido úrico. É considerado um antioxidante plasmático potente, uma vez que na presença de ácido ascórbico, é capaz de proteger as membranas de eritrócitos da ação de ROS. No entanto, alguns estudos demonstram que o ácido úrico pode apresentar um efeito pró-oxidante em ambientes hidrofóbicos, limitando sua função antioxidante exclusivamente em ambientes hidrofílicos (Sautin e Johnson, 2008; Zhao *et al.*, 2014).

No *T. cruzi*, o sistema tripanotiona/tripanotiona redutase e a triparedoxina peroxidases estão entre os principais sistemas de desintoxicação de ROS. A tripanotiona [N^1, N^8 -bis(glutathionyl) spermidine] é também conhecida como ditiol de tripanotiona

(T[SH]₂). É um ditiol de baixo peso molecular, composto por duas moléculas de GSH ligadas covalentemente a espermidina. Ela atua como o GSH em mamíferos, atuando como doador de elétron em diversas reações, sendo que é mais reativa (Irigoín *et al.*, 2008).

A T(SH)₂ é mantida reduzida pela tripanotiona redutase, uma flavoenzima dependente de NADPH (Irigoín *et al.*, 2008). Essa enzima tem sido alvo de estudos para o desenho de novas drogas contra a doença de Chagas. Um inibidor irreversível de tripanotiona redutase, a tioridazina, mostrou-se tripanocida *in vitro* para as formas tripomastigotas e epimastigotas. A avaliação da droga em camundongos comprovou sua eficiência nas fases aguda e crônica da doença. Essa droga é usada como neuroléptico, com efeito tóxico baixo; deste modo, mostra-se um quimioterápico em potencial para a doença de Chagas (Lo Presti *et al.*, 2015).

A triparedoxina peroxidase catalisa a redução de H₂O₂ e outros hidroperóxidos em água ou álcoois, respectivamente. Essa enzima depende da tripanotiona para atuar na desintoxicação e pode estar localizada no citosol ou na mitocôndria. Tem sido observado que a triparedoxina peroxidase é capaz de desintoxicar o peroxinitrito, sendo uma peroxidase eficiente e importante para o parasito (Piñeyro *et al.*, 2011).

1.7. H₂O₂ como sinalizador

As primeiras pesquisas envolvendo o metabolismo de ROS demonstraram o seu potencial tóxico e buscaram diferentes mecanismos de neutralizá-los. No entanto, estudos recentes apontam ROS como potentes sinalizadoras para diversos processos celulares. Neste contexto, o balanço redox é crucial para manter os níveis não tóxicos de ROS. Para isso, é importante o equilíbrio entre a produção de ROS oriundas de processos celulares basais e suas vias de desintoxicação.

O H₂O₂ é uma espécie reativa não radicalar estável, que é capaz de atravessar a membrana celular e levar a mensagem oxidativa a longas distâncias. Essa espécie reativa pode reagir com resíduos de cisteínas de proteínas sensíveis à alteração redox. Essa modificação pode alterar a atividade ou conformação de proteína alvo, modificando a transdução de sinal (Diebold e Chandel, 2016).

ROS podem gerar tanto estresse oxidativo quanto promover a sinalização redox. No primeiro ocorre produção descontrolada de ROS, causando danos irreversíveis aos componentes celulares. Por outro lado, ROS podem regular processos fisiológicos essenciais

através de alterações reversíveis. Um dos fatores que influenciam ROS a desempenharem um papel citotóxico ou sinalizador é a concentração. Em concentrações menores, o H_2O_2 pode oxidar grupos livres de tiol de resíduos de cisteínas, o que pode levar a outras modificações como pontes de dissulfeto, alterando a função da proteína. No entanto, essa oxidação é reversível, enquanto que altos níveis de H_2O_2 pode levar ao estado de oxidação permanente desses resíduos (Case, 2017).

Um dos papéis fisiológicos do H_2O_2 é sobre a parede vascular. Neste contexto, a espécie reativa promove a vasodilatação de vasos sanguíneos, através do relaxamento arterial. Esse relaxamento ocorre pela ativação dos canais potássio, hiperpolarização vascular, mobilização e potencialização da sinalização de cálcio. (Avdonin *et al.*, 2019; Edwards *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2018; Saitoh *et al.*, 2006)

Tem sido descrito também o envolvimento de ROS no ciclo celular, em que é observado um ciclo redox. As células de mamíferos apresentam uma fase quiescente (G_0) e uma fase proliferativa (G_1 , S, G_2 e M). Em células HeLa, é sugerido que conforme as células na fase G_1 progredem no ciclo celular o ambiente torna-se mais oxidativo, com maior produção de ROS (Sarsour *et al.*, 2009). Em fibroblastos embrionários de camundongos, a transição da fase G_1 para a fase S depende de ROS. Essa dependência pode ser devido ao fato de que o H_2O_2 inibe a degradação da ciclina D1, uma das ciclinas envolvidas nessa transição. (Martinez Munoz *et al.*, 2001; Menon *et al.*, 2003).

Embora ROS promovam a progressão regular do ciclo celular, o aumento nos níveis de ROS pode causar a proliferação exarcebada. Esse fato é observado no câncer, em que ROS podem atuar como sinalizadoras para crescimento, metástase, angiogênese entre outros. A alta produção de ROS no câncer é um dos principais fatores que levam a resistência à terapia. Uma das principais razões é a oxidação do DNA e a quebra de fitas duplas, que levam ao acúmulo de mutações (Nowicki *et al.*, 2004; Stanicka *et al.*, 2015). Outro fator que leva a resistência à quimioterapia é a adaptação da célula tumoral, como por exemplo, a ativação do metabolismo de glicose em condições de hipóxia e dano na respiração (Xu *et al.*, 2005).

O aumento da proliferação promovido pelas ROS no câncer é devido principalmente a habilidade da molécula em ativar as vias da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK, do inglês, *mitogen-activated protein kinases*) e PI3K, bem como a regulação negativa do homólogo da fosfatase tensina (PTEN) e proteína tirosina fosfatase 1B (Moloney e Cotter, 2018). Em células de tumor de mama, o H_2O_2 produzido é responsável pela ativação de cinases reguladas por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2, do inglês, *extracellular signal-regulated kinases*) 1/2, que fazem parte da cascata da via MAPK e contribuem para a proliferação e

sobrevivência (Reddy e Glaros, 2007). O H_2O_2 oxida e inativa PTEN que é regulador negativo da via PI3K/AKT. Essa via está relacionada com a sobrevivência e proliferação do tumor (Lee *et al.*, 2002; Lien *et al.*, 2017). A proteína fosfatase 2A (PP2A) é uma enzima que pode regular negativamente a via MAPK. O H_2O_2 pode inibir a PP2A por oxidação de seus resíduos tióis ou favorecer a atuação da enzima por induzir sua translocação para um sítio específico (Sheth *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2015).

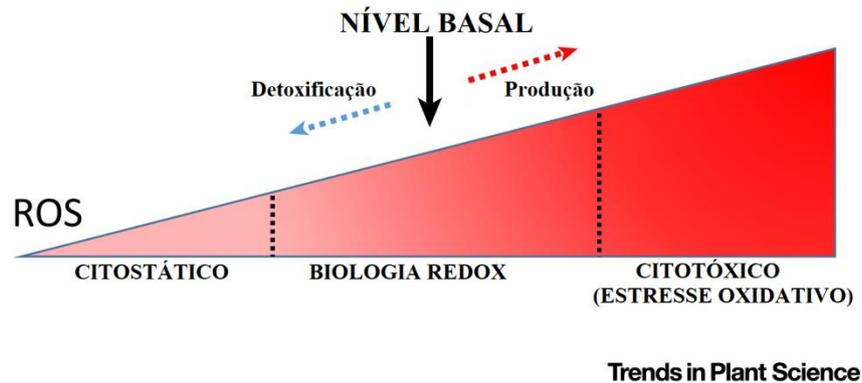
Em plantas, homólogos da oxidase da explosão respiratória (RBOHs, do inglês, *respiratory burst oxidase homologues*) é uma família multigênica, homóloga a NADPH oxidase (Nox) de mamíferos. Essas enzimas têm papel chave na produção de ROS nas plantas onde ROS serão produzidas em resposta aos estresses bióticos e abióticos. Como por exemplo, ocorre a produção de ROS na presença de incidência de luz, o que sugere a participação de ROS para aclimação (Baxter *et al.*, 2014).

ROS produzidas por macrófagos em resposta à infecção por *Pseudomonas aeruginosa* apresenta um papel sinalizador ao invés de citotóxico. Nesse contexto, ROS funciona como segundo mensageiro regulando a atividade de NF- κ B. Como resultado, os macrófagos diminuem sua capacidade fagocítica, o que favorece a bactéria (Hui *et al.*, 2018).

Em *T. cruzi*, ROS induzem a proliferação de formas epimastigotas via ativação de uma proteína cinase dependente Ca^{2+} /calmodulina II (CAMKII, do inglês, *calmodulin-dependent protein kinase II*). No entanto, ROS inibem a diferenciação dessas formas em tripomastigotas metacíclicos (Nogueira *et al.*, 2011; Nogueira *et al.*, 2015). Em contrapartida, ROS são importantes para proliferação intracelular de formas amastigotas, mas ainda não está claro o mecanismo pelo qual isso ocorre (Goes *et al.*, 2016).

A máxima da toxicologia é um frase creditada à Paracelsus: “*What is there that is not poison? All things are poison and nothing is without poison. Solely the dose determines that a thing is not a poison*”. Em tradução livre, “O que não é veneno? Todas as coisas são veneno e nada é sem veneno. Somente a dose determina o que não é veneno.” Pode-se usar essa máxima para interpretar os diferentes papéis de ROS. São os níveis de ROS que irão determinar seu papel sinalizador ou citotóxico (figura 5).

Figura 5 - ROS: A intensidade é o que determina o seu papel



Fonte: modificado por Mittler, 2017.

1.8. Proteína fosfatase 2A (PP2A)

A maioria dos processos fisiológicos envolve pelo menos um evento de fosforilação ou desfosforilação como mecanismo regulatório. A fosforilação de proteínas é realizada por cinases, enquanto que a desfosforilação é feita por fosfatases. A proteína fosfatase 2A (PP2A) pertence à classe de fosfatases que atuam em resíduos de serina/treonina (Revisado por Baskaran e Velmurugan, 2018).

A PP2A pode apresentar-se de forma dimérica ou heterodimérica. A forma dimérica é composta pela subunidade regulatória A (ou PR65) com massa molecular de 65 kilodaltons, e a subunidade catalítica C de 36 kilodaltons. A adição de uma terceira subunidade regulatória forma a PP2A heterodimérica. Essa terceira subunidade é chamada de subunidade B e apresenta-se em quatro diferentes famílias que são mutuamente exclusivas: i) B/PR55, ii) B'/PR61, iii) B''/PR72 e iv) B'''. Existem diferentes isoformas para cada subunidade, sendo duas para a subunidade A, duas para a subunidade C, quatro para a subunidade B, oito para B', quatro para B'' e duas para a B''', que combinadas podem gerar aproximadamente 75 diferentes heteroenzimas PP2A (revisado por Janssens e Goris, 2001).

A PP2A tem sido relacionada em diversos processos fisiológicos e patofisiológicos. A sua expressão é importante para a espermatogênese, embriogênese, o desenvolvimento cardíaco entre outros (Götz e Kues, 1999; Pan *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2018).

Em 2003, González e colaboradores caracterizaram a PP2A em *T. cruzi*. Foi observado que o gene do parasito apresentou cerca de 53% de homologia com o gene humano e o envolvimento da enzima com o processo da amastigogênese (González *et al.*, 2003).

1.9. *Phage display*: uma poderosa ferramenta para descoberta de ligantes

O *Trypanosoma cruzi* usa várias estratégias para invadir a célula do hospedeiro vertebrado. A variabilidade de infectividade presente nas formas evolutivas desafia a pesquisa de novos fármacos. Neste sentido, muitos pesquisadores tentam caracterizar proteínas do parasito envolvidas na interação com o hospedeiro (Lima *et al.*, 2010). Portanto, tecnologias que auxiliam na descoberta de moléculas de superfície podem contribuir para o estudo do *T. cruzi*.

O *phage display* é uma tecnologia que tem sido empregada para isolamento de ligantes, sendo importante para desenvolvimento de novos fármacos e vacinas. Em 1985, George P. Smith descreveu pela primeira vez o fago filamentosso (vírus que infectam bactérias) como vetor de expressão de peptídeos exógenos. O fragmento de DNA exógeno é inserido no gene III do fago filamentosso com consequente expressão na proteína de superfície pIII. A sequência de peptídeo exógeno é inserida no meio da proteína para não comprometer a função da proteína pIII uma vez que a porção aminoterminal é responsável pela interação com a bactéria durante a infecção e que a carboxi-terminal pela morfogênese do vírus (Gron e Hyde-DeRuyscher, 2000; Smith, 1985).

Além da pIII, uma das principais proteínas de superfície utilizada para expressar proteína fusionada é a pVIII. Essa proteína é composta por 50 aminoácidos e 2700 cópias, sendo assim, pode apresentar até 2700 cópias do peptídeo exógeno. Essa proteína é adequada para o *phage display* por compor 87% da massa do vírus e porque 50% dos seus aminoácidos são expostos para a superfície. No entanto, somente pequenos peptídeos exógenos podem ser expostos na pVIII. Para peptídeos maiores, a pIII é a proteína ideal para ser usada na expressão do peptídeo exógeno (Huang *et al.*, 2012). A pVIII na superfície do fago está representada na figura 6.

Uma biblioteca de polipeptídeos pode ser construída baseada na técnica de *phage display*. Os fagos filamentosso da família *Inoviridae* (M13, fd e f1) são os mais utilizados por não matarem a bactéria durante seu ciclo de vida (ciclo lisogênico). A infecção ocorre pela

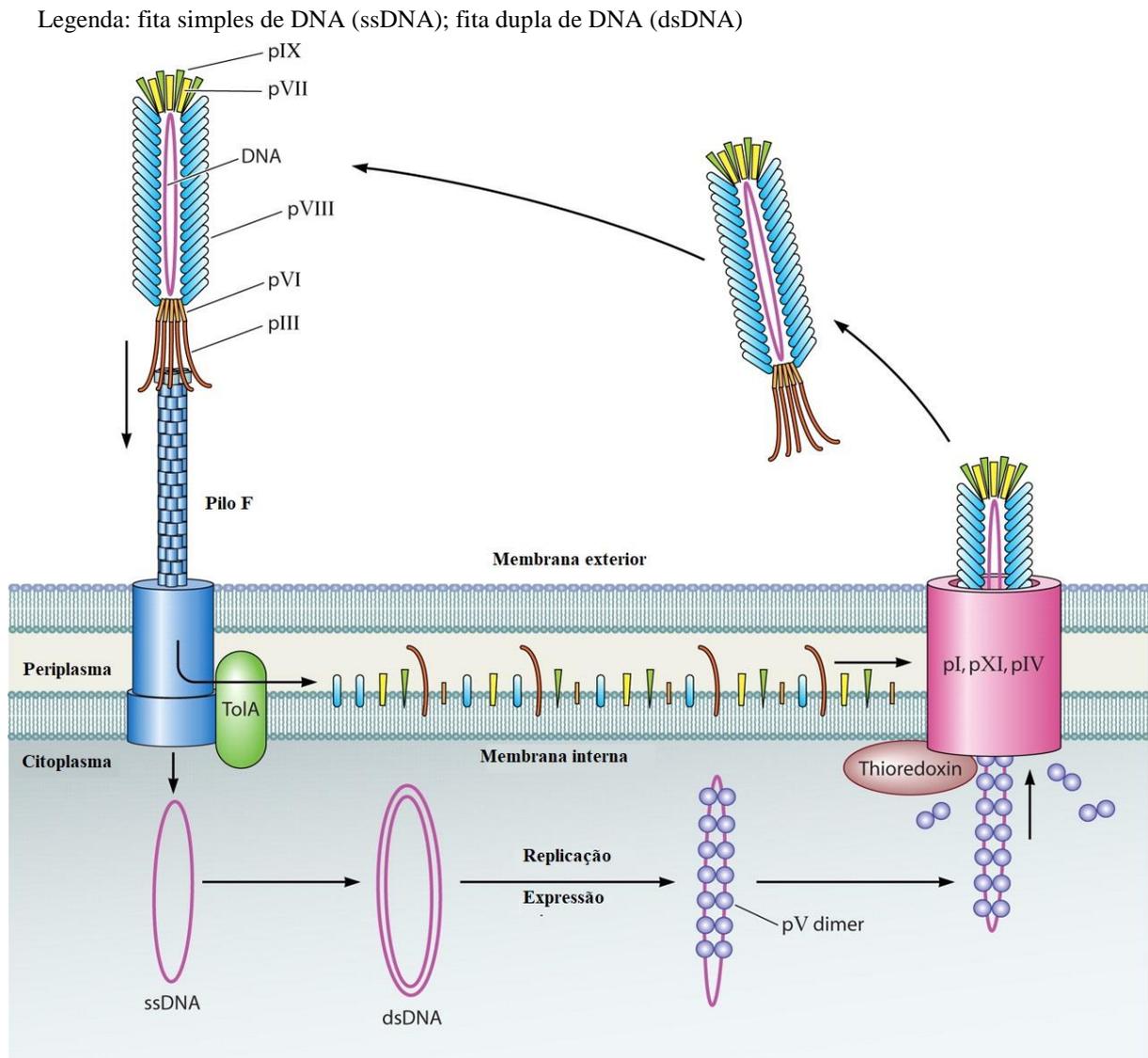
ligação do vírus ao pilo F de bactérias gram negativas que possuem plasmídio F (Hemminga *et al.*, 2010). Na figura 6 está demonstrado o ciclo desse bacteriófago.

Experimentalmente, o *phage display* pode ser dividido em três etapas: (i) construção de bibliotecas de fagos com peptídeos ou anticorpos, (ii) seleção baseada na afinidade e (iii) confirmação dos ligantes selecionados usando ensaios biológicos.

As bibliotecas de fagos podem ser classificadas de acordo com a proteína usada para a construção. As proteínas mais utilizadas para construção de biblioteca de fagos pIII e pVIII são chamadas 3 e 8, respectivamente. Existem diferentes formas de inserção do DNA exógeno, e o fago pode ser classificado de acordo com esta inserção e a proteína de superfície utilizada. Quando a sequência de DNA exógeno é inserido diretamente no genoma do fago, ele é nomeado com o número da proteína, logo se utiliza a proteína pIII, o fago é chamado de tipo 3. A inserção do DNA pode ocorrer através de um vetor plasmidial (*phagemid*), que além da sequência de DNA exógena, possui um gene de resistência à antibiótico. Nesse sistema, o fago é nomeado repetindo o código da proteína duas vezes, com o sinal de “+” no meio. Então se for utilizada a proteína pVIII, o fago será do tipo 8+8. Nesse método ocorre a infecção das bactérias pelos fagos com gene recombinante no *phagemid* e também por fagos com o gene selvagem. O fago que se utiliza de ambos os sistemas, ou seja, o fago que carrega tanto o gene selvagem da proteína quanto o gene recombinante, é nomeado com código da proteína duas vezes. Sendo assim, se a inserção do DNA exógeno ocorre na pVIII, ele é chamado de fago tipo 88 (Tikunova e Morozova, 2009).

A seleção de fagos baseada em afinidade também é conhecida como *biopanning*, e seleciona ligantes de alta afinidade para o alvo. Geralmente, bibliotecas de fagos que expressam peptídeos randômicos são utilizados. O isolamento de fagos que expressam o peptídeo que se liga no alvo é feito através de várias rodadas de seleção. A primeira rodada consiste na incubação da biblioteca de fagos com alta diversidade de clones; por exemplo, 10^9 peptídeos diferentes, com o alvo imobilizado. Em seguida, os fagos que não aderiram ao alvo são lavados e os fagos que foram ligados são eluídos. A população de fagos que ligaram ao alvo são amplificados em bactérias, e submetidas à nova rodada de seleção. Após 2 ou 3 rodadas de seleção, os fagos são propagados e caracterizados (Smith e Petrenko, 1997). Na figura 7 é possível observar o resumo do *biopanning*.

Figura 6 - Ciclo de vida dos fagos filamentosos

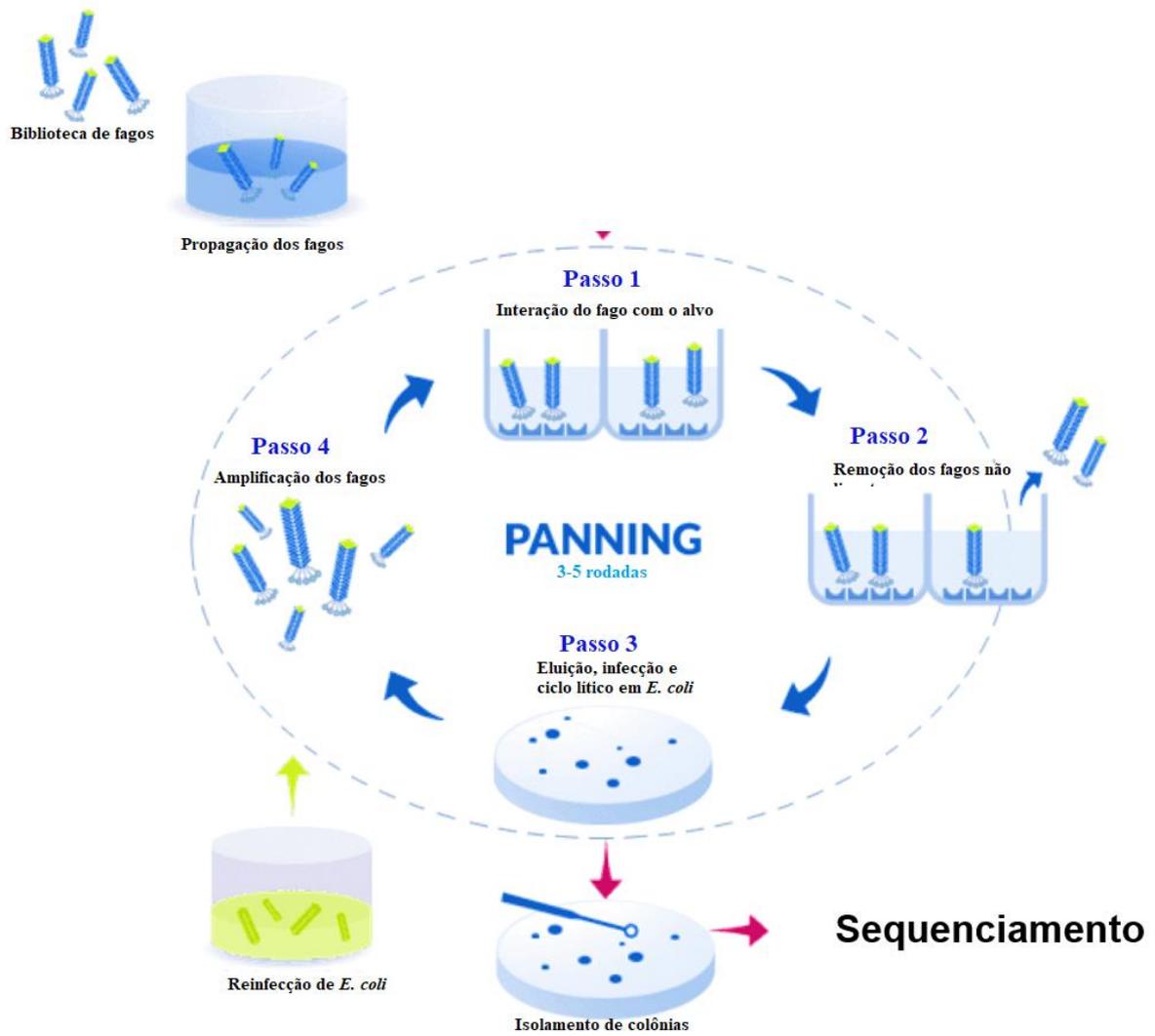


Nota: Fago filamentosos liga no F da bactéria hospedeira, *Escherichia Coli* através de pIII. Então, a proteína TolA do hospedeiro inicia a despolimerização de proteínas de superfície do fago, que permanecem na membrana interna para reciclagem. A ssDNA viral entra no citoplasma e é convertida em dsDNA e inicia a replicação e expressão usando enzimas do hospedeiro. O ssDNA coberto com os dímeros da proteína pV é o precursor viral. O canal formado por pI, pXI, pIV e a enzima do hospedeiro tioredoxina promove a substituição de pV pela pVIII e liberação dos fagos maduros no canal.

Fonte: Modificado de Huang *et al.*, 2012.

Para validação dos resultados de seleção de afinidade, é necessário verificar a ligação do peptídeo solúvel no alvo. Isso é devido a observação de que componentes do capsídeo do vírus podem influenciar na interação do peptídeo exógeno ao alvo (Szardenings, 2003).

Figura 7 - *Biopanning*



Fonte: Modificado de Matsubara, 2012.

1.10. Pesquisa para tratamento da doença de Chagas

A química medicinal envolve a invenção, descoberta, desenho, identificação e preparação de componentes biologicamente ativos. Para isso, grupos de pesquisas multidisciplinares, compreendendo as ciências biológicas, médicas e farmacêuticas trabalham em conjunto para buscar novos compostos bioativos contra patologias, incluindo a doença de Chagas (Wermuth *et al.*, 1998).

A doença de Chagas foi descoberta há 110 anos; no entanto, existem disponíveis para comercialização apenas dois fármacos para tratamento, o benznidazol e o nifurtimox. Ambas drogas apresentam eficácia limitada e efeitos colaterais que levam à interrupção do protocolo de tratamento. Além disso, algumas cepas são naturalmente resistentes aos medicamentos (revisado por Sales Junior *et al.*, 2017).

As doenças negligenciadas, da qual doença de Chagas faz parte, afetam países subdesenvolvidos, causam mortes, incapacidade crônica e pobreza. Apenas 4% dos novos produtos terapêuticos registrados entre 2000 e 2011 foram indicados para doenças negligenciadas. Avaliando os registros de triagem clínica no ano de 2011, somente dois mil e dezesseis casos dentre os mais de 148 mil registrados foram para doenças negligenciadas. Esses dados demonstram o desinteresse de pesquisar essas doenças, incluindo a doença de Chagas. Esse desinteresse pode ser devido ao fato de tais doenças acometerem a população mais pobre, o que não geraria lucro alto para a indústria (Pedrique *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de novos fármacos envolve basicamente duas estratégias diferentes. A primeira apresenta uma abordagem fenotípica, que prioriza a busca de drogas bioativas antes do seu mecanismo de ação. A segunda utiliza-se de abordagens baseadas em alvos, onde ocorre o planejamento racional de fármacos, procurando alvos moleculares para síntese de compostos bioativos.

Na abordagem fenotípica, a seleção de compostos é baseada na modulação relevante da doença sem conhecimento prévio do alvo. A seleção de compostos bioativos são realizados por ensaios *high throughput screening* (Vincent *et al.*, 2015). Em *T. cruzi*, tem-se descritos diversos ensaios *high throughput screening* estágio específico (Buckner *et al.*, 1996; Canavaci *et al.*, 2010). Apesar de alguns inibidores serem descritos, essa tecnologia não forneceu nenhum fármaco para testes clínicos (Andriani *et al.*, 2011; Germain *et al.*, 2011).

O desenvolvimento racional de drogas é baseado na identificação de alvos terapêuticos através do conhecimento da doença. Uma vez identificado o alvo, o fármaco pode ser

desenhado através de diversas metodologias, como bioquímica, cristalografia, farmacologia molecular, entre outras. Nesse contexto, esses recursos buscam entender a interação da droga com o alvo, envolvendo uma relação eficiente entre a estrutura da droga e sua atividade. Dessa forma, a otimização de drogas desenvolvidas a partir do alvo terapêutico é muito mais fácil do que as selecionadas por estratégias fenotípicas (Anderson, 2003; Croston, 2017).

Ambas estratégias apresentam vantagens e desvantagens. A combinação das duas estratégias permite o avanço tecnológico e otimiza tempo e custo no desenvolvimento do fármaco. Um exemplo de combinação é o uso de inibidores da citocromo P450 do *T. cruzi* para tratamento da doença de Chagas.

Os primeiros azóis antifúngicos foram descobertos por seleção fenotípica. Após alguns anos foi descoberto que esses azóis inibiam a síntese de ergosterol através da inibição do citocromo P450. Alguns antifúngicos se mostraram promissores contra o *T. cruzi*, no entanto na fase clínica não apresentaram efeito satisfatório. Esses resultados demonstram a necessidade de desenvolver antifúngicos melhores e mais eficientes. Nesse contexto, o entendimento da estrutura e função da citocromo P450 dos patógenos, abordagem baseada em alvo, permite o desenvolvimento de inibidores mais eficientes. Em contrapartida, ensaios *high throughput*, estratégia fenotípica, foram capazes de descobrir uma nova classe de inibidores com atividade tripanocida (Choi e Roush, 2017; Ferreira de Almeida Fiuza *et al.*, 2018; Lepesheva *et al.*, 2018; Sykes e Avery, 2018).

Neste trabalho, utilizamos duas abordagens diferentes para buscar novos alvos terapêuticos. A primeira consiste em entender a infecção pelo *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado, delimitando o papel de ROS nas formas infectivas. A segunda utiliza-se do recurso de *phage display* para encontrar moléculas de superfície do *T. cruzi* que estão envolvidas na interação parasito-hospedeiro para o desenvolvimento de quimioterápicos ou vacinas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- a) Estudar a participação de espécies reativas de oxigênio (ROS) na amastigogênese de *T. cruzi*;
- b) Selecionar, por *phage display*, peptídeos ligantes a forma infectiva tripomastigotas de *T. cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Analisar o efeito de H₂O₂ e/ou dos antioxidantes: N-acetilcisteína (NAC), glutationa (GSH), urato e peg-catalase, na amastigogênese *in vitro*;
- b) Identificar a participação da proteína fosfatase 2A (PP2A) na amastigogênese induzida por H₂O₂, através da inibição por ácido ocadáico e quantificação de atividade serina/treonina fosfatase durante a amastigogênese;
- c) Mensurar produção de ROS e a expressão de Fe-SODA e Fe-SODB durante a amastigogênese induzida *in vitro* por pH ácido;
- d) Avaliar a função mitocondrial na diferenciação de formas tripomastigotas para amastigotas induzidas por pH ácido.
- e) Analisar o efeito do inibidor de mPTP, ciclosporina, e mitoTEMPO na produção de H₂O₂;
- f) Selecionar fagos com alta afinidade para tripomastigotas usando uma biblioteca de peptídeos;
- g) Sequenciar os fagos com afinidade para as formas tripomastigotas, determinando os peptídeos expressos;
- h) Caracterizar a afinidade e especificidade do peptídeo selecionado;
- i) Investigar atividade do peptídeo sobre a invasão de células Vero por formas tripomastigotas;

3 METODOLOGIA

a. Cultura de células de mamífero

Células Vero (rim de *Cercopithecus aethiops*) foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%, penicilina 70 µg/mL, estreptomicina 100 µg/mL e bicarbonato de sódio 3,7 g/L (DMEM completo) e mantidos a 37 °C sob atmosfera com 5% de CO₂. As passagens das células foram realizadas a cada três dias em cultura.

b. Obtenção de formas tripomastigotas de cultura

Células Vero foram infectadas com tripomastigotas sanguíneos na proporção de 5:1 (Vero:parasito) por 24 horas. Alternativamente, as células Vero foram infectadas com tripomastigotas derivados de cultura na proporção 5:1 (Vero:parasito) por 3 dias. Após o período de interação, retiraram-se os parasitos livres e as células foram mantidas em cultura com meio DMEM + SFB 5% a 37 °C sob atmosfera com 5% de CO₂. As formas tripomastigotas de cultura foram coletadas no sobrenadante a partir do 6º dia após a infecção. Debris celulares e amastigotas foram separados por centrifugação diferencial, com a velocidade de 500 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Formas amastigotas extracelulares foram recolhidas do sobrenadante de células Vero infectadas por mais de 15 dias, sem troca de meio DMEM + SFB 5%.

c. Amastigogênese *in vitro*

A diferenciação *in vitro* de formas tripomastigotas para formas amastigotas foi baseada na técnica descrita por Hernández-Osorio e colaboradores em 2010. Em resumo, tripomastigotas oriundos de sobrenadante de células Vero foram incubados em meio DMEM

pH 5.0, ajustado com MES 1M, na proporção de 5×10^6 de parasitos por mL a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂ (Hernández-Osorio *et al.*, 2010).

Para avaliar a influência do H₂O₂, de antioxidantes e da proteína fosfatase 2A (PP2A) na amastigogênese *in vitro*, as células foram incubadas em meio ácido por 2 horas na presença ou na ausência de: H₂O₂ (10 µM, 30 µM ou 50 µM), NAC (1 mM), urato (1 mM), GSH (1mM), peg-catalase (100 U/L) e/ou ácido ocadáico (0,1 µM), como inibidor da fosfatase 2A. Após o período de incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%. As células foram então coradas com Panótico para contagem diferencial em microscópio de luz no aumento de 1000 vezes ou então incubadas com anticorpo Ssp4 para avaliação da expressão desta proteína.

d. Quantificação da expressão de Ssp4 por citometria de fluxo

Para detecção da proteína de superfície específica de formas amastigotas, Ssp4, formas tripomastigotas de cultura foram induzidas à amastigogênese por 2 horas na presença ou ausência de: H₂O₂ (10 µM, 30 µM ou 50 µM), NAC (1 mM), urato (1 mM), GSH (1mM), e/ou peg-catalase (100 U/L). Alternativamente, formas tripomastigotas e amastigotas foram usadas, ambas como controle negativo e positivo, respectivamente. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos e então incubadas com anticorpo monoclonal anti-Ssp4 2C2, gentilmente cedido pelo Professor Renato Arruda Mortara da Universidade Federal de São Paulo, diluído 1:3200 em Tampão Fosfato de Sódio 100 mM, contendo NaCl 150 mM, pH 7.4 (PBS). Após 1 hora, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti camundongo acoplada com AlexaFluor 488 diluído 1:1000 in PBS. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e a fluorescência foi analisada imediatamente no citômetro Gallios (Beckman Coulter). Os dados foram processados pelo programa Kaluza 1.2 (Beckman Coulter) e normalizados em relação ao tripomastigota não induzido.

e. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para determinar a produção de H₂O₂ liberada no início do estímulo da amastigogênese, formas tripomastigotas de cultura foram incubadas por 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos ou 180 minutos em DMEM pH 5. Alternativamente, formas tripomastigotas de cultura foram estimulados à diferenciação para formas amastigotas por 60 minutos na presença de 0,5 µM do inibidor ciclosporina A (Sandimmun Neoral[®], Novartis, Switzerland) e do antioxidante mitocondrial (2-(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-ylamino)-2-oxoethyl)triphenylphosphonium chloride (mitoTEMPO), 10 nM e 100 nM. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 3000 x g por 10 minutos e ressuspensas em PBS contendo 50 µM de Amplex[®] UltraRed e HRP (Horseradish Peroxidase). Após 30 minutos, as células foram centrifugadas 3000 x g por 10 minutos e a fluorescência no sobrenadante foi quantificada no fluorímetro EnVision[™] multilabel plate reader (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA), utilizando o comprimento de onda de excitação de 530 nm e emissão de 590 nm. Os dados foram calibrados através de uma curva padrão com concentrações crescentes de H₂O₂.

Alternativamente, a produção de ROS foi mensurada por citometria de fluxo utilizando o fluoróforo diacetato acetil éster 5-(e-6)-clorometil-2',7'-diclorohidrofluoresceína (CM-H₂DCFDA). Para isso, as formas tripomastigotas incubadas em DMEM pH 5,0 por 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos e 180 minutos foram centrifugadas 3000 g por 10 minutos. Em seguida, os parasitos foram incubados com 2 µM de CM-H₂DCFDA por 30 minutos. A fluorescência foi quantificada no citômetro Gallios (Beckman Coulter). Os dados foram processados pelo programa Kaluza 1.2 (Beckman Coulter) e expressos em relação à amostra em que os parasitos foram incubados em DMEM pH neutro (tempo 0 minutos).

f. Expressão gênica das superóxidos dismutases dependentes de ferro do *T. cruzi*

Para avaliar a expressão gênica, o ácido ribonucleico (RNA, do inglês *ribonucleic acid*) de formas tripomastigotas induzidas à amastigogênese por 0 (não indução), 5, 30, 60, 90 ou 180 minutos foi extraído usando TRIzol[®] de acordo com as orientações do fabricante (Invitrogen). O RNA foi solubilizado em água ultrapura tratada com 0,1% de dietil pirocarbonato (DEPC) e armazenados a -80 °C até o momento de uso. As concentrações de RNA foram determinadas por dosagem espectrofotométrica em NanoVue[™] (GE Healthcare).

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado usando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription[®] (Applied Biosystems).

Para quantificar a expressão gênica foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, conhecida também como qPCR. Para isso, foi utilizado o fluoróforo SYBR *Green* que interage com a dupla fita de DNA durante o processo de amplificação e emite fluorescência. As reações de PCR em tempo real foram feitas em triplicatas na plataforma cobertt Rotor-Gene Q (Qiagen, EUA). A reação de amplificação do DNA ocorreu nas seguintes condições:

- A. 94 °C por 5s para a pré desnaturação da fita;
- B. 40 ciclos de 95 °C por 3s para desnaturação e 65 °C por 1s para o anelamento e extensão da fita.

Ao final de cada reação, foi realizada uma curva de dissociação (a fluorescência foi medida continuamente entre 60 °C e 95 °C) que foi usada para verificar a especificidade, a contaminação (amplificação do controle negativo) da reação qPCR, e se havia a amplificação de dímeros de oligonucleotídeos.

Para a amplificação dos genes da isoforma mitocondrial (Fe-SODA - AY864908.1) e citosólica (Fe-SODB - XM_804459) do *T. cruzi* foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores no programa Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Rozen e Skaletsky, 2000).

Os genes da Fe-SOD foram normalizados pelo gene de referência TCZ (Martins *et al.*, 2008) ou GAPDH (Takagi *et al.*, 2019). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies (IDT). A quantificação da expressão relativa ao tripomastigota não induzido (0 minutos) foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Tabela 1 – Sequência de oligonucleotídeos utilizados na qPCR

Gene	Oligonucleotídeo Senso	Oligonucleotídeo Antisenso	Fonte
Fe-SOD A	CGCCGGATGTCCCTTAACA	CCGGCGGTTTTCAAAGTCC	A autora, 2019
Fe-SOD B	ATGGTCTTCA GCATTCTCC	CTTGTCGTAGTGGAGCGTCA	A autora, 2019
TCZ	CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT	CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG	Martins <i>et al.</i> , 2008
GAPDH	AGCACCACGTTGTGTCTAAC	TACGAGTGGATCGTCGTCAT	Takagi <i>et al.</i> , 2019

Fonte: A autora, 2019; Martins *et al.*, 2008; Takagi *et al.*, 2019

g. Respirimetria de alta resolução

Para avaliar a função mitocondrial durante a amastigogênese, um dos métodos utilizados foi a respirometria de alta resolução no Oxygraph-2k (O2k, OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria). Para isso, tripomastigotas foram incubados em meio DMEM pH neutro e SFB 10% ou em DMEM pH 5,0 por uma ou duas horas. Em seguida, as células foram centrifugadas e 5×10^7 parasitos foram incubados na câmara de 2 mL do OROBOROS com DMEM neutro + 10% SFB ou DMEM pH 5,0. O fluxo de O_2 foi mensurado em tempo real e o protocolo de respiração para células intactas descrito por Gnaiger em 2014 foi aplicado (Gnaiger E, 2014). Os dados foram analisados no programa DatLab 5. O consumo de O_2 basal foi mensurado após pelo menos 10 minutos de incubação na câmara. Em seguida, o fluxo máximo de O_2 foi induzido pela adição do desacoplador Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP). Para avaliar o consumo de O_2 residual (ROX), aquele que não está relacionado a fosforilação oxidativa, foi adicionado o inibidor do complexo III, antimicina (2 $\mu\text{g/mL}$). A respiração mitocondrial foi corrigida por ROX, obtendo os parâmetros de Rotina (consumo de O_2 basal/ROX) e sistema de transferência de elétrons (ETS, do inglês electron transfer system) (consumo máximo de O_2 após adição de FCCP/ROX).

Antes de cada experimento, o sensor oxigênio foi equilibrado com o meio utilizado na leitura, DMEM pH neutro ou DMEM pH ácido a 37 °C.

h. Potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi quantificado por citometria de fluxo usando o fluoróforo éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM). Esse indicador potenciométrico se acumula na matriz mitocondrial carregada negativamente. A perda de potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) promove o escape do TMRM da matriz, reduzindo assim sua fluorescência. Dessa forma, o sinal de fluorescência está relacionado diretamente com o potencial de membrana mitocondrial. O potencial de membrana mitocondrial foi calculado através da razão da intensidade de fluorescência das células incubadas com TMRM (F_{TMRM}) pela intensidade de fluorescência das células incubadas com TMRM e FCCP (F_{FCCP}). Inicialmente, foi titulada a

concentração de TMRM. Para isso, formas tripomastigotas foram incubadas com concentrações crescentes de TMRM (10 nM – 500 nM) por 30 minutos em PBS na presença ou ausência de 1 μ M de FCCP nos últimos 5 minutos. A concentração de 50 nM de TMRM apresentou o $\Delta\Psi_m$ ($F_{\text{TMRM}}/F_{\text{FCCP}}$) submáximo, e portanto foi escolhida para os demais experimentos.

Para avaliar o $\Delta\Psi_m$ durante a amastigogênese, formas tripomastigotas foram induzidas à diferenciação em DMEM pH 5,0 por 1 ou 2 horas. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com 50 nM de TMRM por 30 minutos em PBS com ou sem adição de 1 μ M de FCCP. A fluorescência das células foi quantificada no citômetro Gallios (Beckman Coulter). Os dados foram analisados no programa Kaluza 1.2 (Beckman Coulter).

i. Atividade da proteína fosfatase 2A (PP2A)

A atividade de PP2A foi determinada pela quantificação da atividade fosfatase usando o ensaio específico para PP2A (catálogo 17-313, Millipore). Formas tripomastigotas de cultura foram incubadas em DMEM pH ácido por 30 minutos, 60 minutos e 180 minutos na ausência (controle) ou presença de H_2O_2 . Após cada tempo as células foram lavadas com tampão Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0 e ressuspensas em tampão de lise contendo NP40 0,5%, EDTA 20 mM, EGTA 20 mM, HEPES 50 mM e coquetel inibidor de protease (AEBSF 1.04 mM, aprotinin 800 nM, leupeptin 20 μ M, bestatin 40 μ M, pepstatin A 15 μ M e E-64 14 μ M). Depois da lise, as amostras foram centrifugadas a 9300 x g a 4 °C por 10 minutos, e o sobrenadante foi coletado para quantificação da concentração de proteína de acordo com Lowry e colaboradores (Lowry *et al.*, 1951). A quantificação da atividade de PP2A foi realizada de acordo com o fabricante. Resumidamente, as amostras foram incubadas com 100 μ M de substrato peptídico (KRpTIRR). Após 10 minutos de reação, 25 μ L das amostras foram transferidos para placa de 96 poços e 100 μ L da solução reveladora de Malaquita Green foram adicionados. As amostras foram incubadas por 15 minutos para desenvolvimento da cor e então a absorvância foi mensurada em 650 nm. A atividade foi calculada a partir da concentração de fosfato formada (nmol de fosfato/minuto/mg de proteína) baseado na curva padrão de fosfato e descontando a quantidade de fosfato livre presente na amostra.

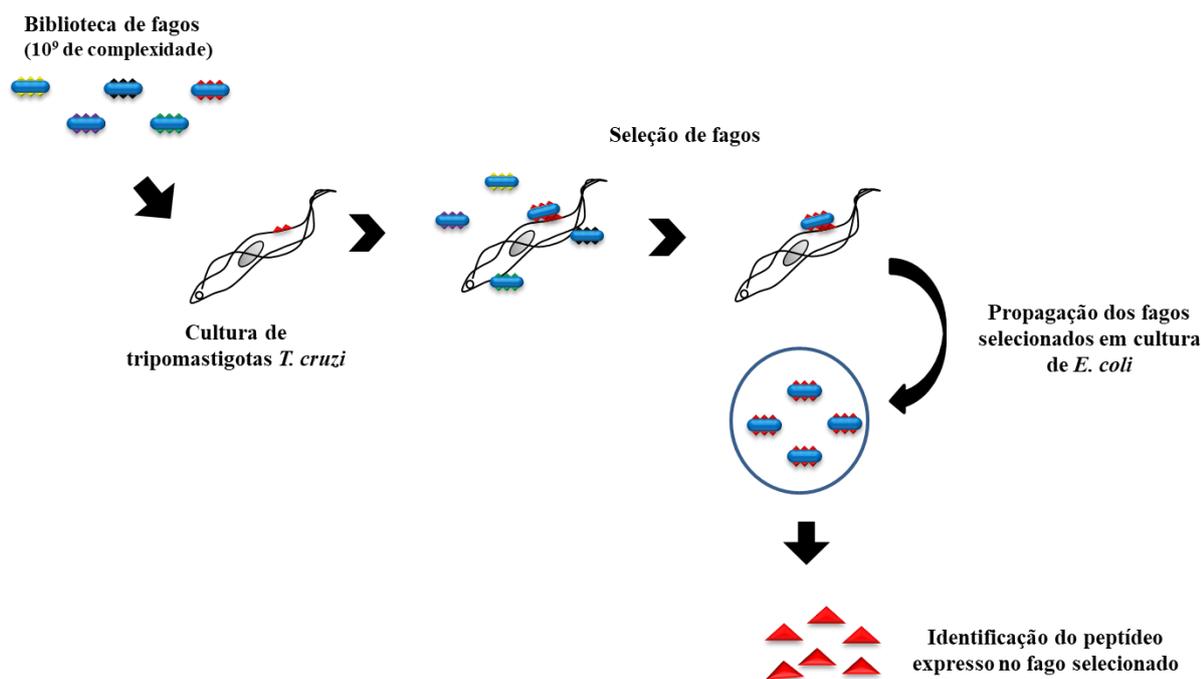
j. Seleção de fagos (*biopanning*)

O biopanning foi realizado no laboratório do Professor Dr^o Marcelo Jacobs-Lorena, no Departamento de Microbiologia Molecular e Imunologia, situado na Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health em Baltimore, nos Estados Unidos.

A biblioteca de fagos utilizada apresenta complexidade inicial de 10^9 peptídeos diferentes. Os peptídeos randômicos estão fusionados na região N terminal da proteína de superfície pVIII no fago filamentosso f88.4 (Bonnycastle *et al.*, 1996). Os fagos foram amplificados em *Escherichia coli*. A seleção foi feita com a incubação de 10^{11} fagos (média de 100 fagos para cada sequência) com formas tripomastigotas (no mínimo 10^7) por 30 minutos em DMEM sem SFB no gelo. Em seguida, os tripomastigotas foram extensivamente lavados, no mínimo seis vezes, para remoção dos fagos fracamente ligados ao parasito. Os fagos ligados foram eluídos e amplificados em *Escherichia coli* e precipitados da cultura com 16% polietileno glicol (PEG). Os fagos amplificados foram usados para nova seleção seguindo os mesmos procedimentos descritos acima. No total, foram realizadas três seleções.

Após a terceira seleção, 25 colônias individuais de fagos foram isoladas, o *fagemid* foi purificado e sequenciado pela [©]Macrogen corp. As sequências foram analisadas no programa Chromas (Technelysium Pty Ltd) e o aminoácido exógeno inserido no fago foi inferido com base nos nucleotídeos encontrados.

O processo está resumido na figura 8.

Figura 8 - *Biopanning* no *T. cruzi*

Fonte: A autora, 2019

k. Síntese do peptídeo N3

O peptídeo N3 foi selecionado para os futuros experimentos e sintetizados pela Peptide 2.0 Inc. O peptídeo foi sintetizado acoplado com biotina na região N terminal e com uma ponte dissulfeto entre as cisteínas 2 e 11.

Em paralelo, foi sintetizado o peptídeo *scramble*, que apresenta os mesmos aminoácidos e modificações do peptídeo N3, porém em ordem diferente.

As sequências dos peptídeos estão na tabela 2.

Tabela 2 - Sequência de aminoácidos

Peptídeo	Sequência de aminoácidos
N3	QC CI QFPQFLW CP
<i>Scramble</i>	F C QLWPQFP IC Q

Legenda: As cisteínas que se ligam formando uma ponte dissulfeto estão em vermelho.

Fonte: A autora, 2019

As estruturas trimensionais dos peptídeos foram desenhadas utilizando os programas da ACD/Labs 2018.2.1 (Advanced Chemistry Development, Inc.) ACD/ChemSketch e ACD/3D view.

l. Ensaio de ligação do peptídeo N3

Para avaliar a capacidade de ligação específica do peptídeo N3, formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, e também as células Vero foram fixadas como paraformaldeído 4% por 15 minutos e incubadas com 0,15 mg/mL do peptídeo N3 ou peptídeo *scramble overnight*. Em seguida, as células foram lavadas, bloqueadas com 4% de albumina por 1 hora. Em seguida, os peptídeos ligados foram detectados pela incubação com conjugado estreptavidina Alexa Fluor[®] 594 (Thermo Fisher Scientific) diluído 1:500 em PBS por 1 hora. A quantificação dos peptídeos ligados foi realizada analisando a intensidade de fluorescência máxima analisada no citômetro Gallios (Beckman Coulter) e processados pelo programa Kaluza 1.2 (Beckman Coulter). Em paralelo, para as formas tripomastigotas, a fluorescência do peptídeo ligado foi observada também por microscopia de fluorescência. Para isso, foi utilizado o reagente ProLong[®] Gold Antifade com 4',6-diamidino-2-phenylindole (Invitrogen).

m. Invasão de células Vero por *T. cruzi*

Formas tripomastigotas foram incubadas com os peptídeos (N3 ou *scramble*) 0,15 mg/mL por 15 minutos no gelo. Em seguida, os parasitos foram marcados com éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) de acordo com as instruções do fabricante. Após a marcação, os parasitos foram usados para infectar células Vero na proporção 10:1 (Vero:parasito) por 3 horas. Em seguida, a infecção foi analisada por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência.

Para citometria de fluxo, as células Vero plaqueadas e infectadas em placa de 6 poços foram tripsinizadas, lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 1%. Em seguida, a fluorescência intracelular das células Vero foi quantificada em Gallios (Beckman Coulter) e analisada no programa Kaluza 1.2 (Beckman Coulter). A invasão foi relacionada à intensidade de fluorescência do CFSE.

Para a microscopia de fluorescência, as células Vero foram plaqueadas e infectadas em lâminas com 8 câmaras estéreis. Após 3 horas de interação, parasitos livres foram retirados e as células fixadas com paraformaldeído 1% e o parasito intracelular foi visualizado e

quantificado no microscópio de fluorescência. A entrada do parasito nas células Vero foi analisada como a média de parasitos por célula.

n. Análise estatística

Todos os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism. Para todos os resultados foram aplicados o One-way anova pós teste de Tukey ou Dunnet, exceto para análise da expressão gênica (figura 14) que foi realizado o teste *T-student*.

4 RESULTADOS

a. H₂O₂ acelera a diferenciação de formas tripomastigotas para amastigotas

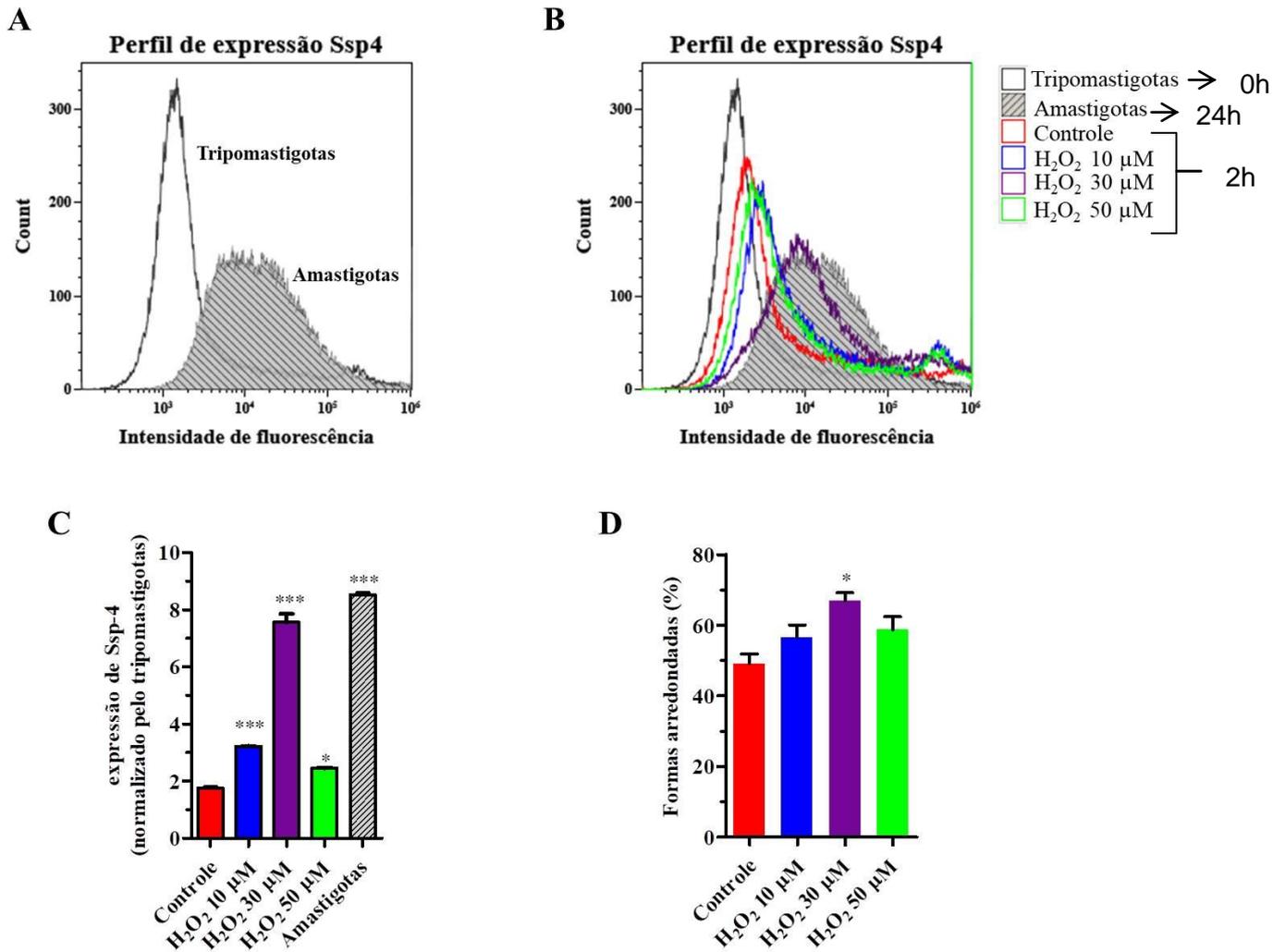
Investigamos o efeito de diferentes concentrações de H₂O₂ (10 µM, 30 µM e 50 µM) nas primeiras 2 horas de indução da amastigogênese por pH ácido *in vitro*.

A proteína Ssp4 é expressa apenas na superfície de amastigotas. Na figura 9A é observado o perfil de expressão da Ssp4 nas formas tripomastigotas de cultura e amastigotas axênicos. A mediana relativa de fluorescência foi normalizada para as formas tripomastigotas, que foi considerada 1. As formas amastigotas obtiveram mediana de fluorescência 8 vezes maior que formas tripomastigotas (figura 9A).

Após duas horas de diferenciação em pH ácido, os parasitos expressaram 76% mais de Ssp4. A presença de H₂O₂ aumentou ainda mais a expressão de Ssp4, sendo a concentração de 30 µM mais eficiente, aumentando em 4 vezes a expressão em comparação ao controle (figura 9B e 9C).

Este resultado foi corroborado na contagem diferencial das formas de *T. cruzi* no microscópio de luz (figura 9D). Em duas horas no DMEM pH 5,0, cerca de 49% dos parasitos apresentavam formas arredondadas. Novamente a concentração de 30 µM de H₂O₂ mostrou-se mais efetiva que as outras, aumentando em 30% o percentual de formas amastigotas em relação ao controle.

Considerando esses resultados, o H₂O₂ foi capaz de aumentar a diferenciação. Foi possível observar que a concentração de 30 µM apresentou o maior efeito.

Figura 9 - Efeito do H₂O₂ na amastigogênese *in vitro*

Legenda: (A) Histograma de fluorescência de Ssp4: comparação entre formas tripomastigotas e amastigotas; (B) Histograma de fluorescência de Ssp4 durante 2 horas de amastigogênese na presença e ausência de H₂O₂; (C) Expressão de Ssp-4 após indução à amastigogênese por 24 horas (amastigotas) ou 2 horas na ausência (controle) ou presença de H₂O₂; (D) Contagem de formas arredondadas de *T. cruzi* em microscópio óptico, após 2 horas de amastigogênese na presença e ausência de H₂O₂.

Nota: Após a indução da diferenciação por 2 horas, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído. Para análise da contagem de formas arredondadas no microscópio óptico os parasitos foram corados com Panótico. Para análise da expressão de Ssp4 por citometria de fluxo, as células foram incubadas por 1 hora com anticorpo anti-Ssp4 1:3200, seguida da incubação com anticorpo secundário fluorescente conjugado com Alexa[®] Fluor 488. No gráfico C os valores são relativos a amostra tripomastigotas e os resultados são expressos como média ± desvio padrão de um experimento representativo de dois experimentos independentes. Em D, os resultados são expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes. A análise estatística de ambos os gráficos (C e D) foi realizada por One-way Anova, pós teste *Dunnnett* realizados onde * p < 0.05 em relação ao controle.

Fonte: A autora, 2019.

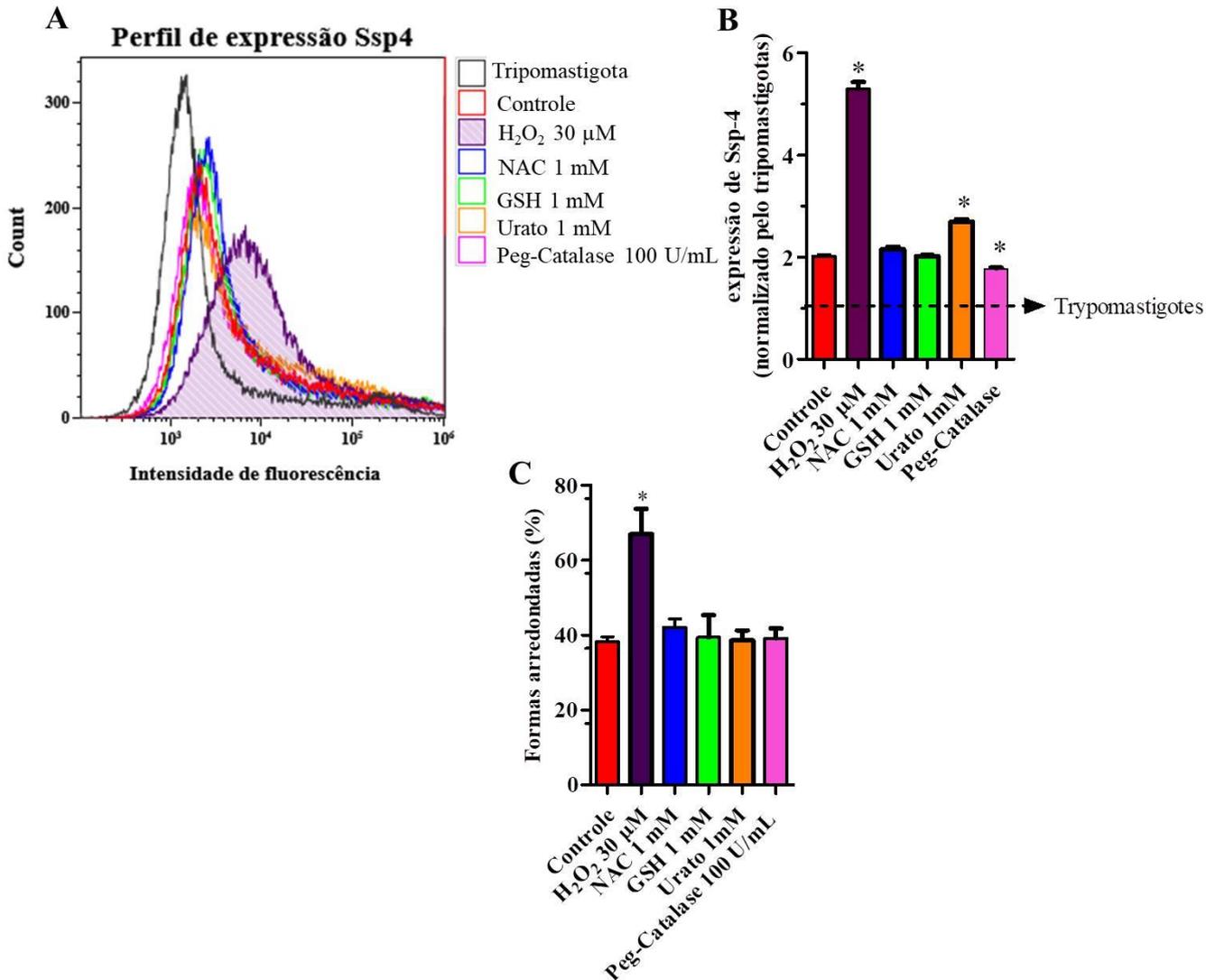
b. Peg-catalase: único antioxidante que reverteu totalmente o efeito do H₂O₂ na amastigogênese

Os antioxidantes, NAC e GSH não interferiram na diferenciação de formas tripomastigotas em formas amastigotas. Esses resultados foram observados tanto na expressão de Ssp4 quanto na contagem diferencial (figura 10A, 10B e 10C). Os antioxidantes, urato e peg-catalase afetaram levemente a expressão de Ssp-4, mas não alteraram o percentual de formas arredondadas . quando comparados com os parasitos não tratados.

Embora os antioxidantes sozinhos não tenham alterado a amastigogênese, foi investigado se a presença deles poderia interferir na ação de H₂O₂ na diferenciação.

Mesmo na presença de NAC ou GSH, o H₂O₂ aumentou o número de formas arredondadas em aproximadamente 50% (figura 11C). Os resultados foram corroborados pela expressão de Ssp4, onde o H₂O₂ mesmo na presença de NAC ou GSH aumentou significativamente a expressão desta proteína de superfície (figura 11B). Em contrapartida, o tratamento com o urato reduziu 50% do efeito H₂O₂.na diferenciação, tanto na quantificação de formas arredondadas (figura 11C) quanto na análise da expressão de Ssp4 (figura 11B). Vale ressaltar que apesar de ter reduzido o efeito do H₂O₂ na amastigogênese *in vitro*, as amostras com urato + H₂O₂ apresentaram um número maior de células diferenciadas do que o controle, aproximadamente 25% e 86% de formas arredondadas e de expressão de Ssp4, respectivamente (figura 11C e 11B).

A, PEG-catalase foi capaz de impedir que o H₂O₂ acelerasse a transformação de tripomastigotas em amastigotas (figura 11C). Além disso, peg-catalase reduziu a expressão de Ssp4 em 18%,.

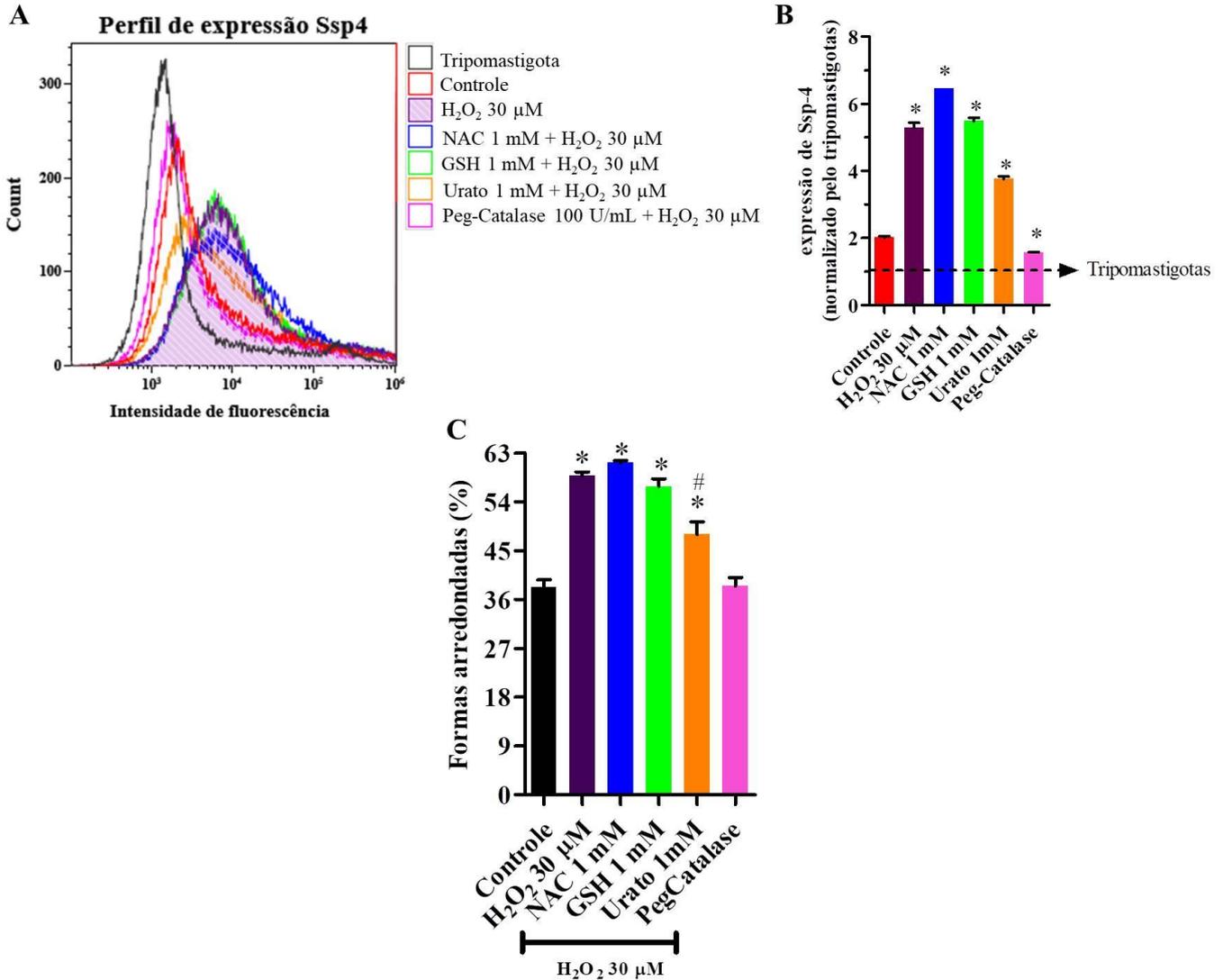
Figura 10 - Efeito de antioxidantes na amastigogênese *in vitro*

Legenda: (A) Histograma de fluorescência da expressão de Ssp4 durante 2 horas de amastigogênese na presença dos antioxidantes NAC, GSH, Urato e peg-catalase; (B) Expressão de Ssp-4 após indução à amastigogênese por 2 horas na ausência (controle) ou presença dos antioxidantes NAC, GSH, Urato e peg-catalase; (C) Contagem de formas arredondadas de *T. cruzi* em microscópio óptico após 2 horas de amastigogênese na presença dos antioxidantes NAC, GSH, Urato e Peg-Catalase.

Nota: Após a indução da diferenciação por 2 horas, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído. Para análise da contagem de formas arredondadas no microscópio óptico, as células foram coradas com Panótico. Para análise da expressão de Ssp4 por citometria de fluxo, as células foram incubadas por 1 hora com anticorpo anti-Ssp4 1:3200, seguida da incubação com anticorpo secundário fluorescente conjugado com Alexa[®] Fluor 488. No gráfico B os valores são relativos a amostra tripomastigotas e os resultados são expressos como média ± desvio padrão de um experimento representativo de dois experimentos independentes. Em C, os resultados são expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes. A análise estatísticas de ambos os gráficos (B e C) foi realizada por One-way Anova, pós teste *Dunnnett* realizados onde * $p < 0.05$ em relação ao controle.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 11 - PegCatalase reverte a ação do H₂O₂ na diferenciação



Legenda: (A) Histograma de fluorescência de Ssp4 durante 2 horas de amastigogênese na ausência (controle) e na presença de H₂O₂ e os antioxidantes NAC, GSH, Urato e peg-catalase; (B) Expressão de Ssp-4 após indução à amastigogênese por 2 horas na ausência (controle) ou presença de H₂O₂ e dos antioxidantes NAC, GSH, Urato e peg-catalase; (C) Contagem de formas arredondadas de *T. cruzi* em microscópio óptico, após 2 horas de amastigogênese na ausência (controle) e na presença de H₂O₂ sozinho ou concomitante com os antioxidantes NAC, GSH, Urato e peg-catalase;

Nota: Após a indução da diferenciação por 2 horas, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído. Para análise da contagem de formas arredondadas no microscópio óptico, as células foram coradas com Panótico. Para análise da expressão de Ssp4 por citometria de fluxo, as células foram incubadas por 1 hora com anticorpo anti-Ssp4 1:3200, seguida da incubação com anticorpo secundário fluorescente conjugado com Alexa[®] Fluor 488. No gráfico B os valores são relativos a amostra tripomastigotas e os resultados são expressos como média ± desvio padrão de um experimento representativo de dois experimentos independentes. Em C, os resultados são expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes. A análise estatísticas de ambos os gráficos (B e C) foi realizada por One-way Anova, pós teste *Tukey* realizados onde * p < 0.05 em relação ao controle e # p < 0.05 em relação ao grupo tratado com H₂O₂.

Fonte: A autora, 2019.

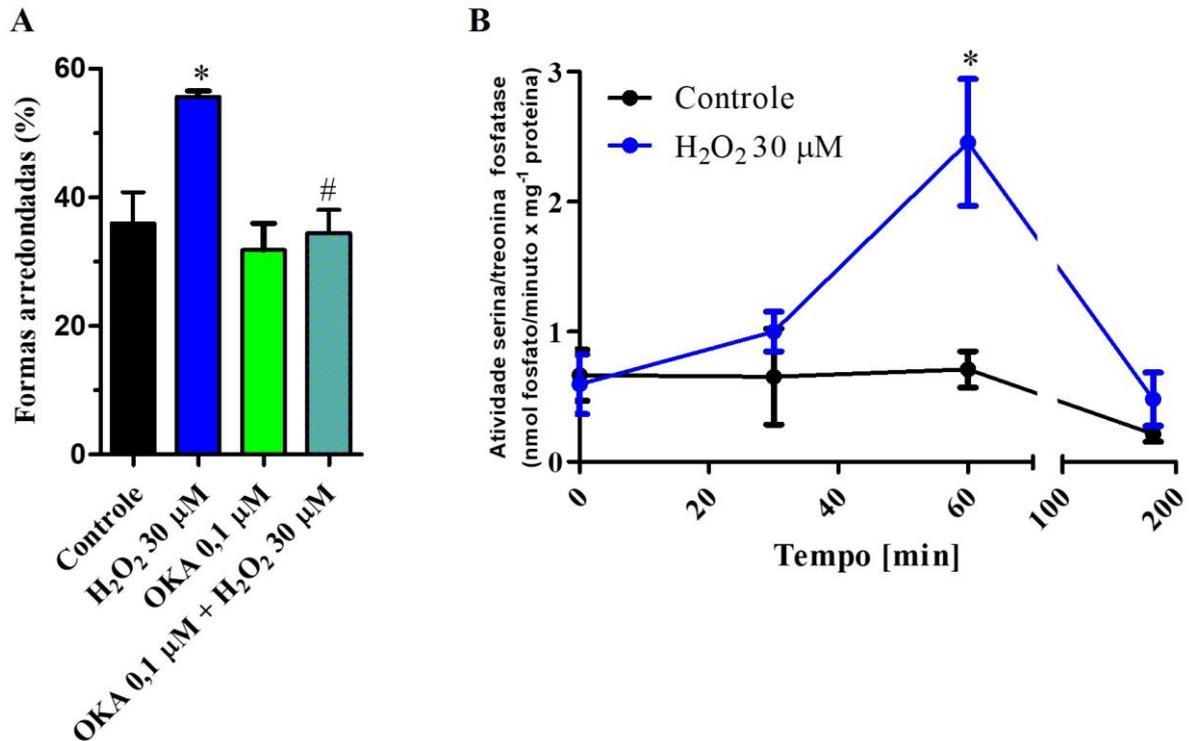
c. PP2A participa da indução da amastigogênese pelo H₂O₂

Como mostrado na figura 12A, a adição de 0,1 µM de OKA não foi capaz de interferir na amastigogênese. Porém, a inibição do PP2A impediu que o H₂O₂ aumentasse a diferenciação induzida por pH ácido.

A fim de corroborar a participação de PP2A na diferenciação por H₂O₂ foi analisada a atividade serina e treonina fosfatase na presença ou ausência de ROS durante a amastigogênese. Para isso, formas tripomastigotas foram incubadas em DMEM pH 5,0 por diferentes tempos (30, 60 e 180 minutos) na presença ou ausência de H₂O₂.

Na figura 12B pode-se observar que a adição exógena de H₂O₂ aumentou a atividade de PP2A cerca de 3 vezes. No entanto este aumento foi observado apenas após 60 minutos de incubação, reduzindo sua atividade para o nível do controle após este tempo.

Figura 12 - Envolvimento de PP2A na amastigogênese induzida por H₂O₂



Legenda: (A) Contagem de formas arredondadas de *T. cruzi* em microscópio óptico, após 2 horas de amastigogênese na presença e ausência de H₂O₂ na ausência ou presença do inibidor de PP2A. (B) Atividade serina/treonina fosfatase durante a amastigogênese.

Nota: Em (A) após a indução a diferenciação por 2 horas, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído e coradas com panótico. As formas arredondadas foram quantificadas em microscópio de luz. Em (B) formas tripomastigotas foram induzidas à diferenciação na presença ou ausência de de H₂O₂ por 30, 60 e 90 minutos. Os resultados em A e B são expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes. A análise estatística de ambos os gráficos foi realizada por One-way Anova[®], pós teste Tukey realizados onde * p<0,05 em relação ao controle e #p < 0.05 em relação ao grupo tratado com H₂O₂.

Fonte: A autora, 2019.

d. O estímulo à amastigogênese pelo pH ácido induz a produção de ROS

Conforme evidenciado na figura 9, a adição exógena de H₂O₂ foi capaz de acelerar a diferenciação. O *T. cruzi* é capaz de produzir ROS intracelularmente em resposta ao ambiente, como por exemplo, em hipóxia (dados do grupo ainda não publicados). Nesse contexto, avaliamos a produção de ROS pelo parasito ao ser estimulado a se diferenciar em pH ácido.

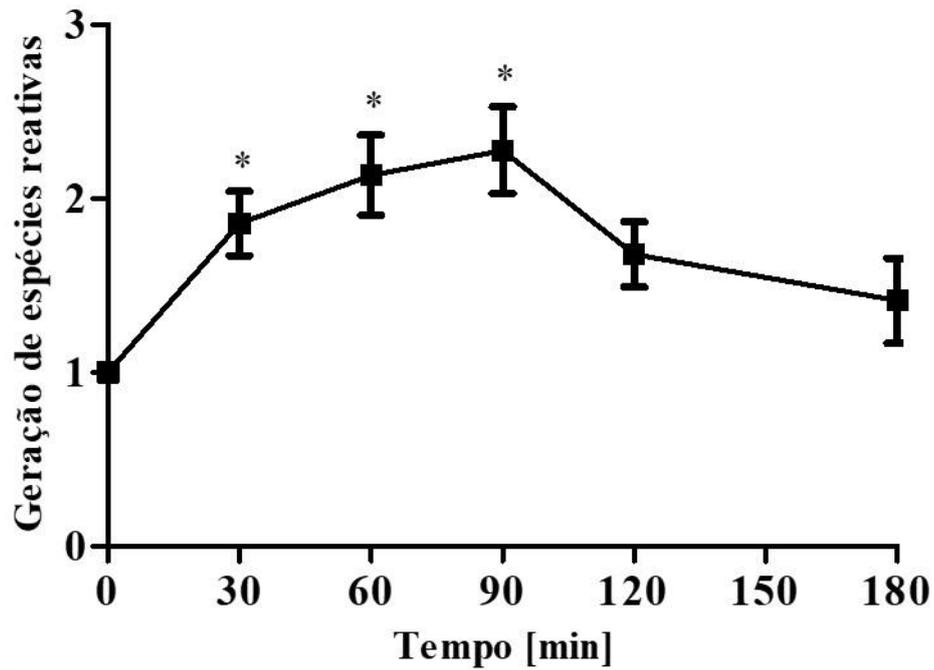
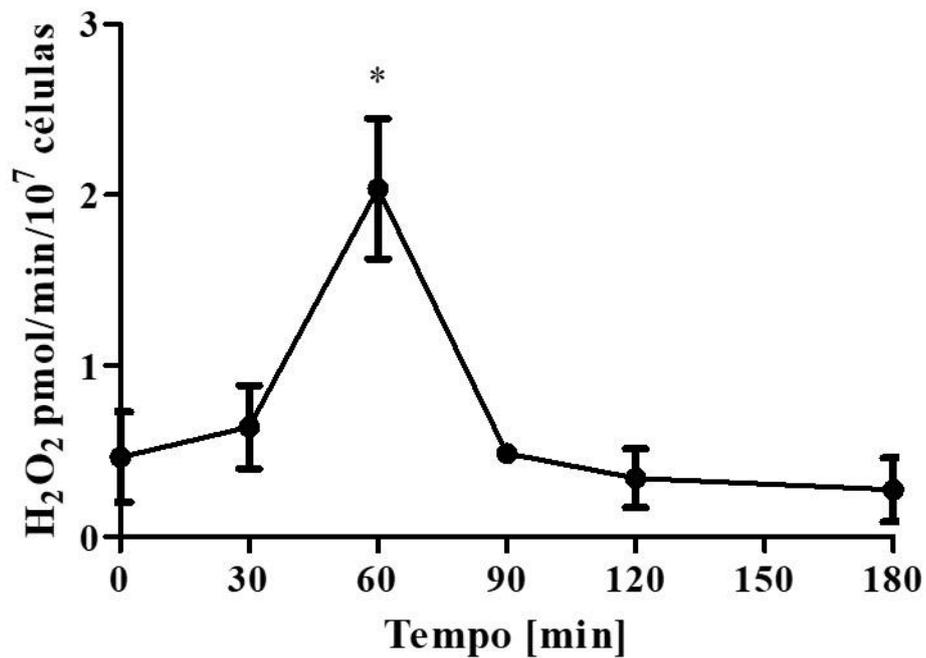
A produção de ROS intracelular foi quantificada por citometria de fluxo usando o fluoróforo CM-H₂DCFDA. Essa sonda é capaz de atravessar a membrana plasmática e sofre a

ação de esterases, formando assim grupos clorometil que reagem com tióis. A subsequente oxidação desse grupamento por ROS forma um composto fluorescente. Desta maneira, a quantificação dos adutos fluorescentes é uma medida indireta da produção de ROS. Para caracterizar produção de ROS pelo *T. cruzi* em ambiente ácido, formas tripomastigotas de cultura foram incubadas em DMEM pH 5,0 por 30, 60, 90, 120 e 180 minutos. Em seguida, ROS intracelular foi quantificado em relação às formas tripomastigotas incubadas em DMEM pH neutro (tempo 0) (figura 13A).

Nos primeiros 30 minutos de incubação em meio ácido, o parasito produziu 85% a mais de ROS. O aumento foi ainda maior nos tempos seguintes de 60 e 90 minutos, onde o *T. cruzi* induzido à diferenciação produziu cerca duas vezes mais ROS do que as células em ambiente de pH neutro. Porém, após os 90 minutos de estímulo a produção decaiu para 68% e 41% após 120 e 180 minutos, respectivamente (figura 13A).

Para corroborar os dados de produção de ROS foi realizado outro ensaio medindo especificamente a produção endógena de H_2O_2 usando o reagente Amplex™ UltraRed. Este composto é substrato para HRP que reage com H_2O_2 proporcionalmente e produz o Amplex® UltroxRed que fluoresce. O desenho experimental é o mesmo descrito anteriormente. No entanto, após a incubação dos parasitos em DMEM pH 5,0 adicionou-se o reagente Amplex™ UltraRed por 30 minutos e o H_2O_2 liberado foi quantificado através da fluorescência. Assim como os dados da citometria, essa técnica mostrou que o meio ácido induz a produção de H_2O_2 . Nos primeiros 30 minutos de incubação, a média de H_2O_2 produzido foi 37% maior que o tempo zero, mas não foi estatisticamente significativo. No entanto, após 60 minutos em meio ácido, os parasitos liberaram aproximadamente 2 pmol de H_2O_2 /minuto/ 10^7 parasitos, cerca de 4 vezes mais que os parasitos em meio neutro. No entanto, após 90 minutos os parasitos liberaram a mesma quantidade de H_2O_2 , que no tempo 0, aproximadamente 0,5 pmols. Nos tempos seguintes as células tendem a produzir menos H_2O_2 , porém não foram significativamente diferentes as células que não foram incubadas em DMEM pH 5 (figura 13B).

Figura 13 - Produção de ROS estimulada pelo pH ácido

A**B**

Legenda: (A) Produção intracelular de ROS durante a diferenciação usando a sonda CM-H₂DCFDA e quantificada por citometria de fluxo; (B) Produção de H₂O₂ durante a diferenciação utilizando o Amplex[®] UltraRed e mensurado por fluorímetro de placa.

Nota: A produção de ROS intracelular (A) foi normalizada para as células não estimuladas com pH ácido. Os resultados são expressos por média ± erro padrão de 4 experimentos independentes (A) ou três experimentos independentes (B). A análise estatística foi realizada por One-way Anova, pós teste *Dunnett*, com * p<0,05 em relação ao controle.

Fonte: A autora, 2019.

e. A indução da amastigogenese por pH ácido modula a expressão de Fe-SODA

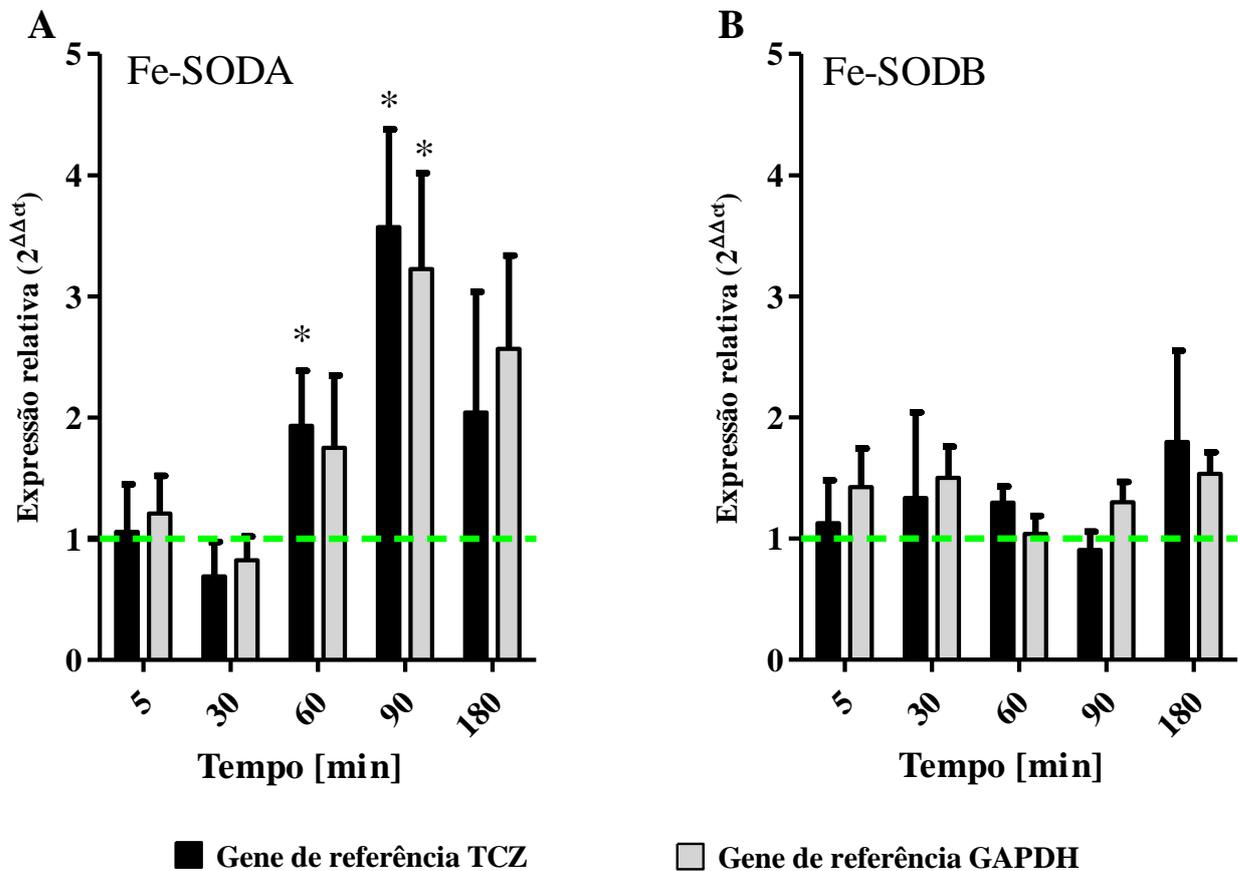
Considerando que o *T. cruzi* produz H_2O_2 durante a amastigogênese, foi quantificada a expressão gênica de uma das principais fontes da produção desta ROS, a superóxido dismutase dependente de ferro (Fe-SOD) do parasito. Foram analisadas a expressão das duas principais isoformas, Fe-SODA (isoforma mitocondrial) e Fe-SODB (isoforma citosólica). Para isso, utilizou-se a técnica de PCR em tempo real, também conhecida como qPCR, para quantificar as mudanças na expressão de RNA mensageiro (mRNA, do inglês Messenger RNA) dessas Fe-SODS durante o estímulo à amastigogênese. Foi utilizado o método $2^{\Delta\Delta Ct}$, em que a variação de expressão foi calculada em relação as formas tripomastigotas não induzidas à diferenciação. A expressão gênica de GAPDH e TCZ foram utilizadas como referência (expressão constitutiva).

A expressão de Fe-SODA aumentou depois de 60 minutos de indução por pH ácido quando o gene TCZ foi usado como referência. Nesse tempo, os parasitos induzidos apresentaram 93% mais RNAm de Fe-SODA. No entanto, apesar da análise por outro gene constitutivo, o GAPDH, mostrar que os tripomastigotas induzidos a diferenciação apresentaram 75% mais mRNA de Fe-SODA que tripomastigotas não induzidos, esta diferença não foi estatisticamente diferente. Em contrapartida, após 90 minutos de indução, a expressão de Fe-SODA foi fortemente aumentada em cerca de três vezes, tanto nas análises em que o TCZ foi usado como gene de referência, quanto nas análises nas quais o gene de referência foi GAPDH. Posteriormente, a expressão de Fe-SODA foi reestabelecida para os níveis dos tripomastigotas não induzidos que permaneceram em pH neutro (Figure 14A).

Por outro lado, a expressão gênica de Fe-SODB não foi alterada significativamente durante a amastigogênese (Figure 14B).

Os resultados da figura 14 demonstraram que a indução da amastigogênese modulou apenas a expressão gênica da isoforma mitocondrial, sugerindo uma possível participação da mitocôndria durante o processo de diferenciação.

Figura 14 - Expressão de Fe-SODA e Fe-SODB durante a amastigônese



Legenda: (A) Expressão relativa do gene Fe-SODA; (B) Expressão relativa do gene Fe-SODB.

Nota: Os resultados são expressos por média ± erro padrão de 4 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando teste T-student, com * p<0,05 em relação ao controle.

Fonte: A autora, 2019

f. Modulação da fisiologia mitocondrial durante a diferenciação *in vitro*

Os resultados anteriores (figura 13 e 14) sugerem que o *T. cruzi* gera H₂O₂ durante a amastigônese através da Fe-SOD mitocondrial. Portanto, investigou-se a função mitocondrial após a indução do processo desta diferenciação. Com este intuito, formas tripomastigotas foram induzidas à diferenciação em pH ácido por 1 hora e 2 horas. Em

seguida, a função mitocondrial foi avaliada por dois parâmetros: respiração celular e potencial de membrana mitocondrial.

A respiração celular foi avaliada pelo Oxygraph-2k. Inicialmente comparamos se há diferença do perfil de respiração celular em tripomastigotas cuja a leitura no Oroboros foi realizada em meio ácido ou neutro.

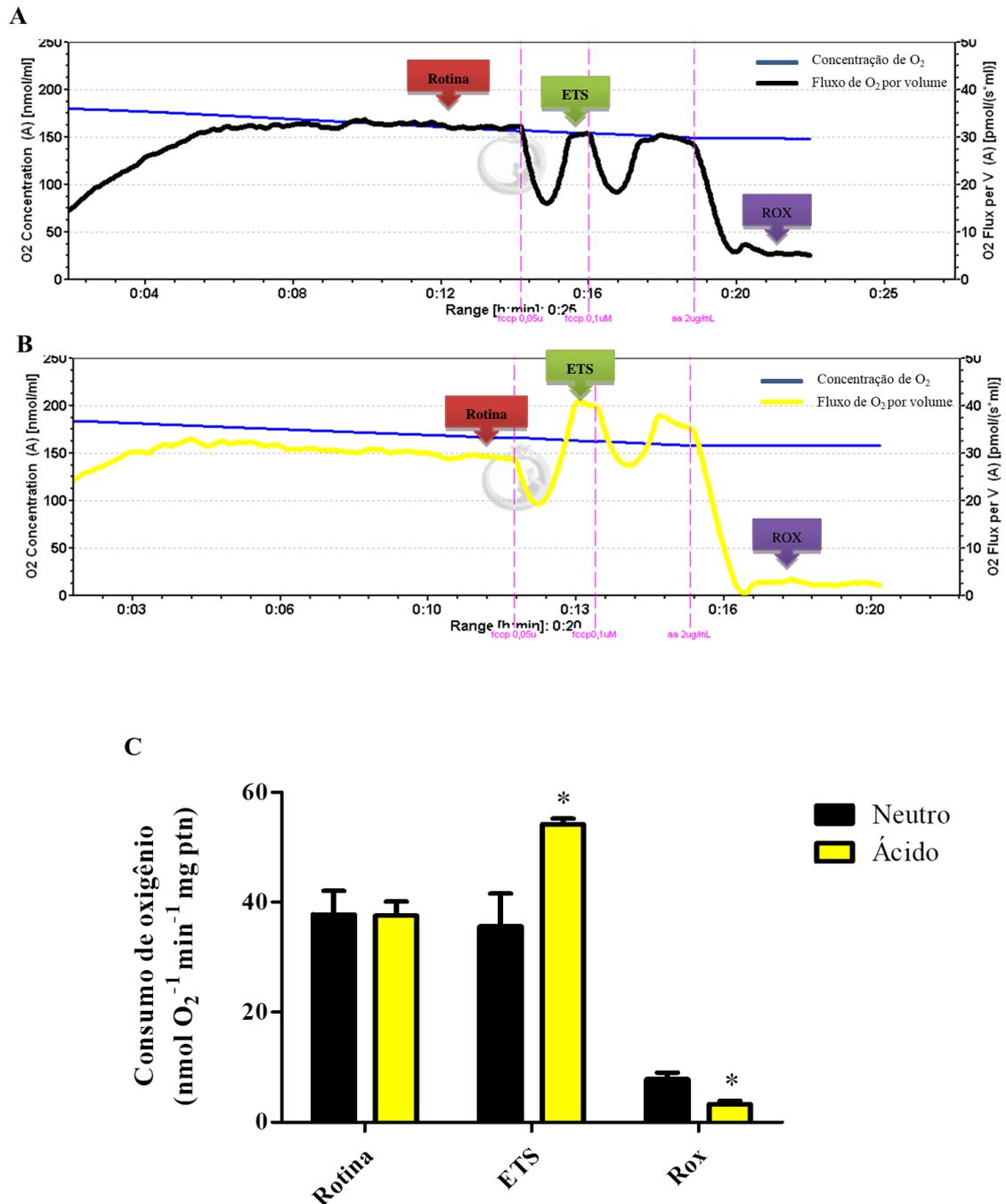
Na figura 15, observamos que o pH do meio não interfere no consumo inicial de O₂ (rotina). No entanto, as formas tripomastigotas em meio DMEM pH 5,0 mostraram maior capacidade fosforilativa, ETS, cerca de 52% maior que no meio neutro. Além disso, em DMEM neutro os parasitos consumiram duas vezes mais O₂ não ligado à respiração celular (ROX). Devido à esses resultados, a respiração celular após o estímulo ácido (1 hora e 2 horas) foram aferidas em meio DMEM pH 5,0 no Oxygraph-2k.

Após 1 hora de indução em pH ácido, os parasitos consumiram duas vezes menos oxigênio. E perderam aproximadamente 50% da sua capacidade máxima respiratória (figura 16).

Após duas horas de amastigogênese, o resultado é ainda mais drástico. Nesse caso, a respiração inicial é 89% menor, com 90% de perda da capacidade máxima (figura 16). No entanto, a indução da diferenciação em pH ácido não alterou o consumo residual de oxigênio (figura 16).

Esses resultados demonstram que a respiração celular é reduzida durante a amastigogênese de modo tempo dependente.

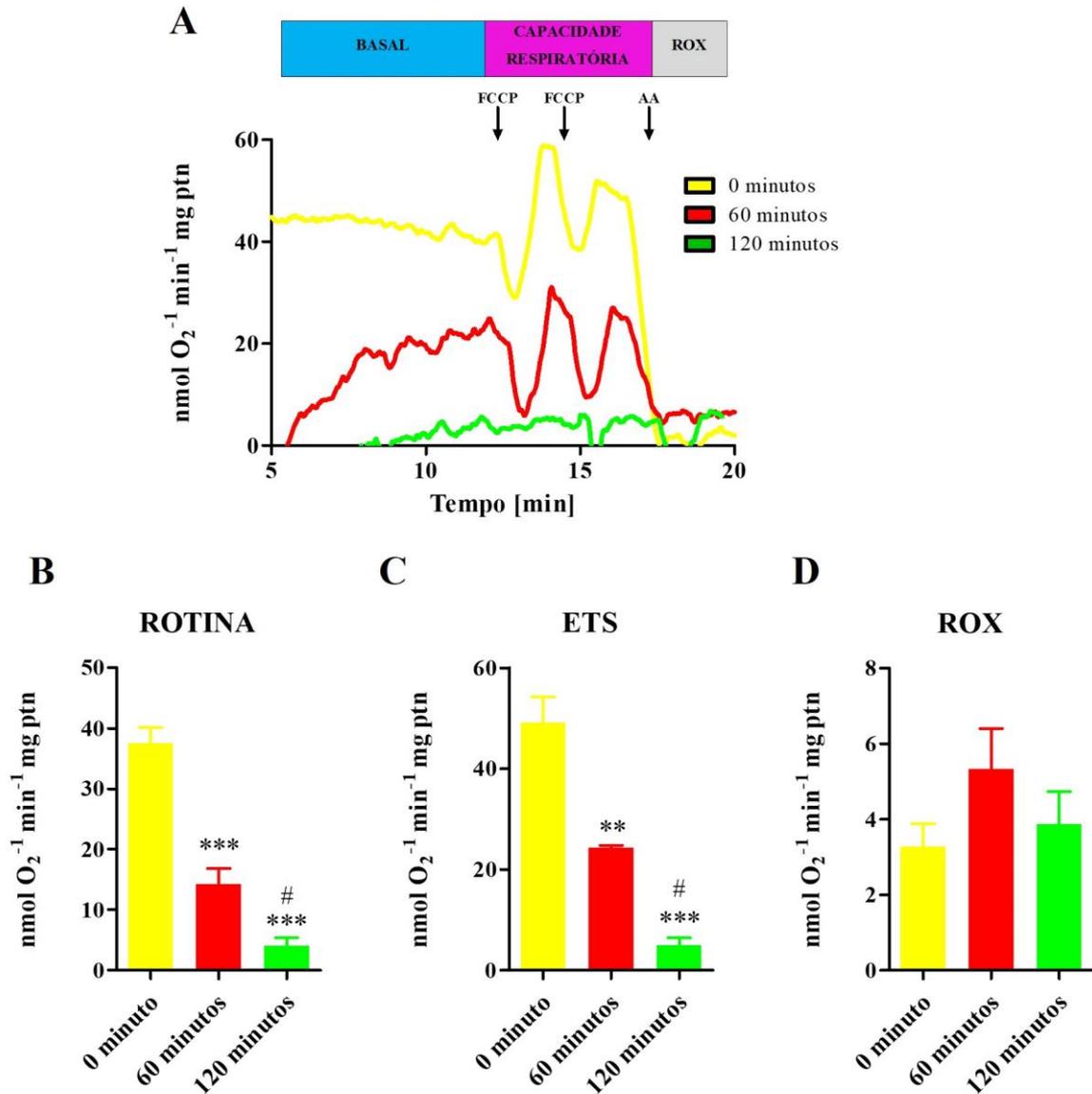
Figura 15 - Respiração celular de formas tripomastigotas



Legenda: (A) Formas tripomastigotas em DMEM pH neutro + SFB 10 % na câmara do Oxygraph-2k; (B) Formas tripomastigotas em DMEM pH 5,0; (C) Para determinar a Rotina e ETS, os valores de consumo oxigênio em nmol/minuto/mg de proteína foram corrigidos por ROX.

Nota: Os valores para determinação de Rotina, ETS e ROX foram obtidos através do programa DatLab. Os gráficos A e B são representativos de 4 experimentos realizados em duplicata. Os resultados do gráfico C são expressos como média ± erro padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada por One-way Anova[®], pós teste *T-student*, com * p < 0.05.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 16 - Redução do consumo de O₂ durante a amastigogênese

Legenda: (A) Perfil do consumo de oxigênio de formas tripomastigotas não induzidas (0 min) ou induzidas por 60 e 120 minutos. (B) Consumo de oxigênio mitocondrial basal corrigido por ROX (rotina). (C) Capacidade máxima de transferência de elétrons corrigida pelo ROX (ETS) (D) Os valores do consumo de oxigênio não mitocondrial (ROX).

Nota: O gráfico A é representativo de 4 experimentos realizados independentemente. Os resultados do gráfico B-D são expressos como média \pm erro padrão de 4 experimentos independentes realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada por One-way Anova, pós teste Tukey, com * $p < 0.05$ em relação ao grupo 0 minutos e # $p < 0.05$ em relação ao grupo 1 hora.

Fonte: A autora, 2019.

O potencial da membrana mitocondrial gerado durante a fosforilação oxidativa é um componente essencial para síntese do ATP. A perda do potencial pode sugerir a redução da função mitocondrial. Nesse contexto, para avaliar a função mitocondrial durante a amastigogênese foi aferido o potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), usando a sonda TMRM. O $\Delta\Psi_m$ foi determinado por $F_{\text{TMRM}}/F_{\text{FCCP}}$ uma vez que o desacoplador FCCP dissipa o potencial de membrana.

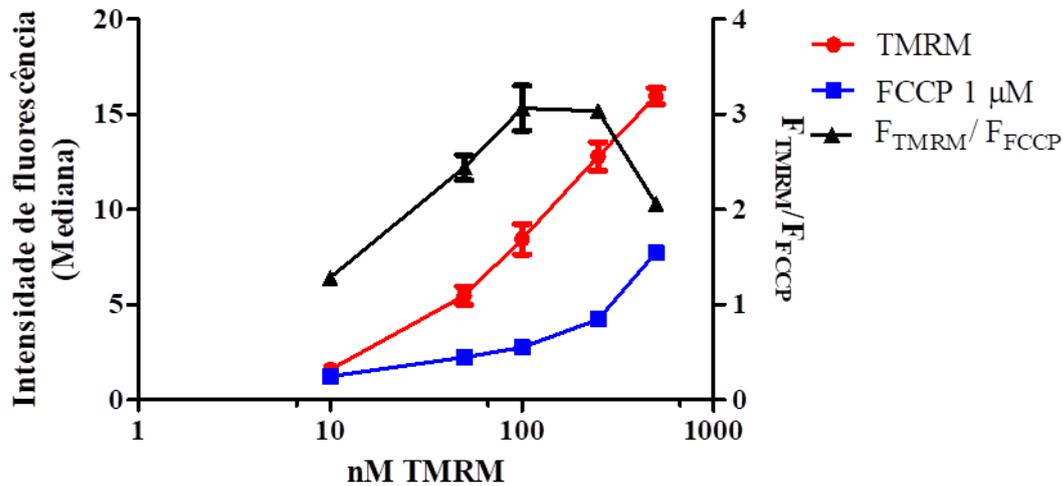
Primeiramente, a concentração de TMRM a ser usada foi determinada. Como observado na figura 17, a concentração de 100 nM de TMRM apresentou a detecção máxima de potencial, cerca de 2 vezes mais do que a concentração de 10 nM e 500 nM. A concentração de 50 nM TMRM apresentou o $\Delta\Psi_m$ 90% maior do que 10 nM e foi escolhida para os outros experimentos.

Similarmente ao que ocorreu na respiração celular, o potencial de membrana mitocondrial foi alterando durante a diferenciação. Após 1 e 2 horas em DMEM pH ácido, os parasitos apresentaram 36% e 35% de redução do potencial, respectivamente (Tabela 3).

O antioxidante mitocondrial mitoTEMPO impediu a produção de H_2O_2 induzida pela amastigogênese. Similarmente, a presença de ciclosporina também inibiu o aumento da produção de H_2O_2 promovida pelo pH ácido após 60 minutos (figura 18).

Em conjuntos, esses resultados mostram que a indução da amastigogênese promove o aumento da produção de ROS através da alteração funcional da mitocondrial, provavelmente pela abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e reforçam a importância do aumento da expressão de Fe-SODA observada na figura 14A.

Figura 17 - Titulação de TMRM



Legenda: (●) Intensidade de fluorescência das formas tripomastigotas na presença de 10 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM e 500 nM de TMRM; (■) Intensidade de fluorescência das formas tripomastigotas na presença de diferentes concentrações de TMRM e 1 µM de FCCP; (▲) Razão fluorescência de tripomastigotas incubados com TMRM pela fluorescência de tripomastigotas incubados com FCCP (F_{TMRM}/F_{FCCP}).

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 3 - Potencial de membrana mitocondrial (F_{TMRM}/F_{FCCP})

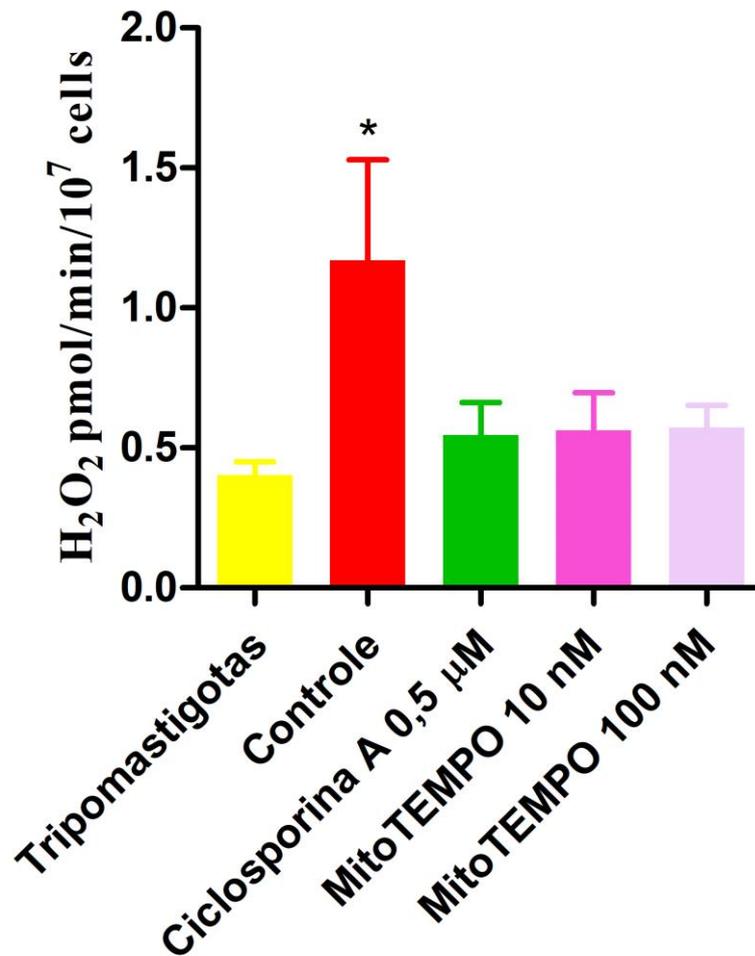
Amostra	0 minutos	60 minutos	120 minutos
Intensidade de fluorescência	$2,77 \pm 0,33$	$1,78 \pm 0,14^*$	$1,81 \pm 0,18^*$

Nota: Formas tripomastigotas foram incubadas em DMEM pH neutro (0 minutos) ou em DMEM pH 5,0 por 60 ou 120 minutos. Em seguida, os parasitos foram incubados por 30 minutos com 50 nM de TMRM com ou sem adição de 2 µM de FCCP nos últimos 5 minutos. O potencial foi calculado como a razão da fluorescência de TMRM das amostras pela fluorescência de TMRM das amostras incubadas com o FCCP.

A análise estatística foi realizada por One-way Anova[®], pós teste *Tukey*, com * $p < 0,05$ em relação ao grupo 0 minutos

Fonte: A autora, 2019.

Figura 18 - Efeito de ciclosporina e mitoTEMPO na produção de H_2O_2



Nota: Formas tripomastigotas de cultura foram induzidas a diferenciação para formas amastigotas por 60 minutos na ausência (controle) ou presença de ciclosporina A (0,5 μ M) e mitoTEMPO (10 nM e 100 nM). Em seguida o H_2O_2 extracelular foi quantificado conforme descrito na metodologia. Os dados são expressos como média \pm erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0.05$ indica diferença estatística em relação ao tripomastigota por análise one-way ANOVA pós teste *Dunnet*.

Fonte: A autora, 2019.

g. O peptídeo N3 foi o mais expresso entre os fagos que obtiveram afinidade com as formas tripomastigotas

Formas tripomastigotas foram submetidas à *biopanning* usando uma biblioteca randômica de peptídeos que em comum apresentam dois resíduos de cisteínas que interagem entre si. Foram realizados dois experimentos independentes, experimento 1 e experimento 2. Após a última rodada de seleção, as bactérias *E. coli* que foram infectadas pelos fagos ligantes

ao parasito foram plaqueadas em placa de Petri, onde cada colônia representa o crescimento de um fago. Então, 23 colônias foram separadas e o DNA plasmidial foi purificado e sequenciado na região responsável pela codificação do gene pVIII.

No primeiro experimento observou-se que as 23 colônias sequenciadas apresentaram variabilidade de 52,2%, com 12 diferentes grupos de peptídeos. Os clones N1 e N3 foram os mais frequentes e , juntos, representaram 82% dos fagos que se ligaram às formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tabela 4). Os peptídeos dividem 58% de identidade e 75% de similaridade, tendo apenas 3 aminoácidos diferentes.

Diferentemente do experimento 1, apenas 18 colônias do experimento 2 apresentaram cromatogramas satisfatórios no sequenciamento. Além disso, nesse experimento foi encontrado apenas um clone majoritário, o O2, que correspondeu a aproximadamente 33% dos fagos que ligaram ao *T. cruzi*. Vale ressaltar que o clone O2 é o mesmo clone N3 do primeiro experimento (Tabela 5).

Ao avaliarmos os dois experimentos juntos, o peptídeo N1 e N3 foram os principais clones expressos, apresentando frequência de 17,07% e 29,7%, respectivamente. Nota-se que o peptídeo N3 foi o único encontrado nos dois experimentos e portanto ele será utilizado nos outros ensaios (Tabela 6).

Tabela 4 - Sequenciamento dos fagos experimento 1

Nome do clone	Sequência de aminoácidos do peptídeo inserida no fago	Número de clones do peptídeo/total	Frequência do peptídeo (%)
N1	QCIDFKVYTWCP	7 (23)	52,17
N2	GCEAWWWKPCN	1 (23)	4,35
N3	QCIQFPQFLWCP	6 (23)	30,43
N6	ICHRDMW-YSCM	1 (23)	4,35
N7	ACGSLVSIMRCI	1 (23)	4,35
N9	ECEWV-HLSFCPE	1 (23)	4,35
N10	HCGEVDSHAACP	1 (23)	4,35
N15	PCTGR-NVTQCL	1 (23)	4,35
N17	GCPMLSRSLCL	1 (23)	4,35
N18	LCH-SSCAALCE	1 (23)	4,35
N19	MGKPSYAGTACT	1 (23)	4,35
N22	QCNQWPQFHRCQ	1 (23)	4,35

Nota: Após o terceiro ciclo de seleção, 25 colônias foram isoladas e sequenciadas. Dessas, 23 obtiveram sequências válidas. Foram encontrados 12 peptídeos diferentes, correspondendo à 52,2% de variabilidade.
Fonte: A autora, 2019.

Tabela 5 - Sequenciamento dos fagos do experimento 2

Nome do clone	Sequência de aminoácidos do peptídeo inserida no fago	Número de clones do peptídeo/total	Frequência do peptídeo (%)
O1	DCRGACCSYDCP	1 (18)	5,55
O2	QCIQFPQFLWCP	6 (18)	33,33
O4	MSQAPNPKRCCM	1 (18)	5,55
O7	RCTKRVFLVNCG	1 (18)	5,55
O9	LCTLPSITNTCN	1 (18)	5,55
O10	MGPHPDVPKCA	2 (18)	11,11
O13	QCPKRESAVVCL	1 (18)	5,55
O15	ACSLTYKG-CV	1 (18)	5,55
O16	DCRKVWIRSKCV	1 (18)	5,55
O20	GCLEEGSWFFCK	1 (18)	5,55
O21	HCQTLAVDGCT	1 (18)	5,55
O23	QCKKAWRITPCL	1 (18)	5,55

Nota: Após o terceiro ciclo de seleção, 25 colônias foram isoladas e sequenciadas. Dessas, 18 obtiveram sequências válidas. Foram encontrados 12 peptídeos diferentes, correspondendo à 66,6% de variabilidade.
Fonte: A Autora, 2019.

Tabela 6 - Sequenciamento dos fagos com alta afinidade

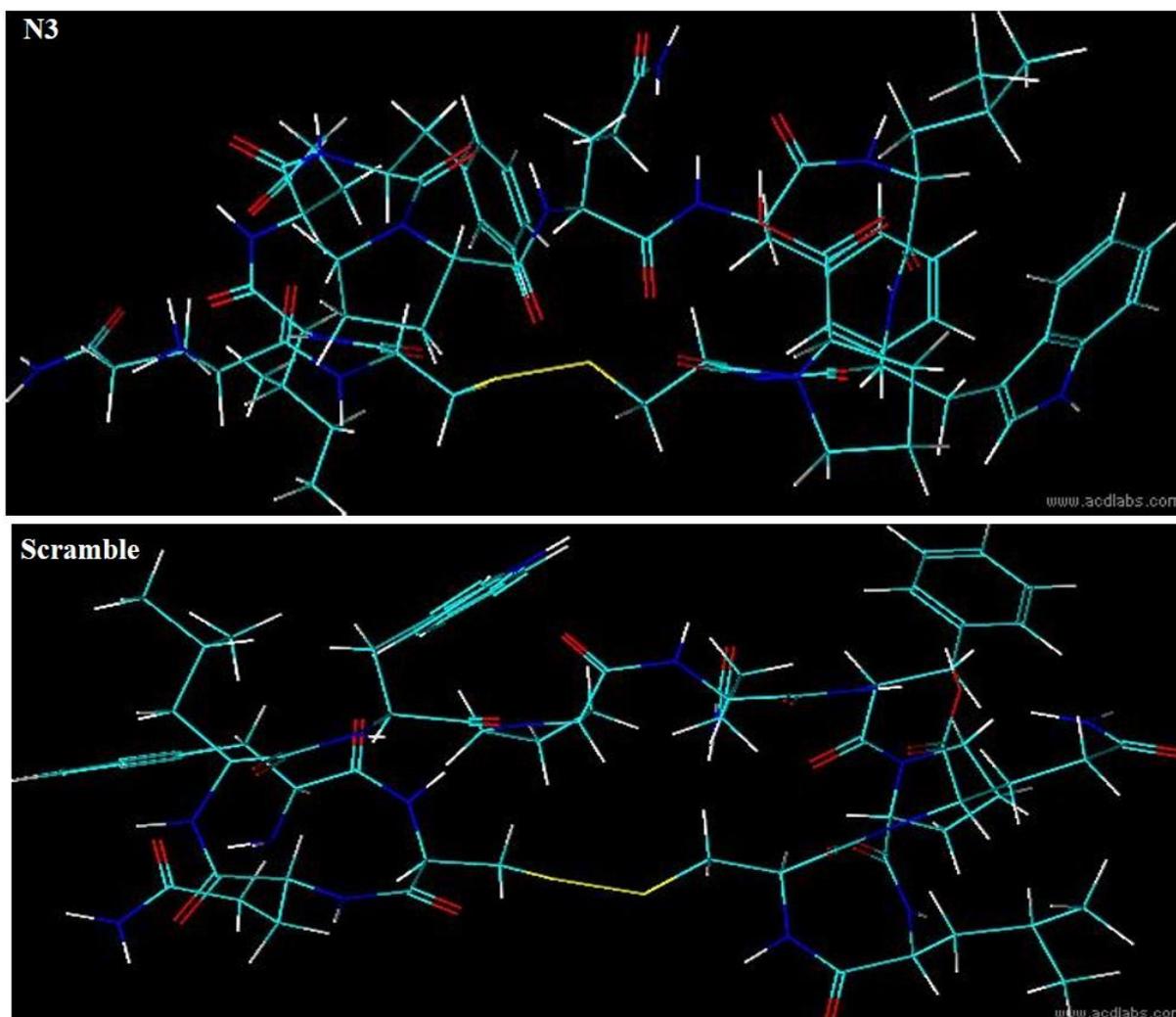
Nome do clone	Sequência de aminoácidos do peptídeo inserida no fago	Número de clones do peptídeo/total	Frequência do peptídeo (%)
N1	QCIDFKVYTWCP	7 (41)	17,07
N2	GCEAWWWKPCN	1 (41)	2,43
N3	QCIQFPQFLWCP	12 (41)	29,27
N6	ICHRDMW-YSCM	1 (41)	2,44
N7	ACGSLVSIMRCI	1 (41)	2,44
N9	ECEWV-HLSFCP	1 (41)	2,44
N10	HCGEVDSHAACP	1 (41)	2,44
N15	PCTGR-NVTQCL	1 (41)	2,44
N17	GCPMLSRSLCL	1 (41)	2,44
N18	LCH-SSCAALCE	1 (41)	2,44
N19	MGKPSYAGTACT	1 (41)	2,44
N22	QCNQWPQFHRCQ	1 (41)	2,44
O1	DCRGACCSYDCP	1 (41)	2,44
O4	MSQAPNPKRCCM	1 (41)	2,44
O7	RCTKRFLVNCG	1 (41)	2,44
O9	LCTLPSITNTCN	1 (41)	2,44
O10	MGPSPSDVPKCA	2 (41)	4,88
O13	QCPKRESAVVCL	1 (41)	2,44
O15	ACSLTYKG-CV	1 (41)	2,44
O16	DCRKVWIRSKCV	1 (41)	2,44
O20	GCLEEGSWFFCK	1 (41)	2,44
O21	HCQTLAVDGCT	1 (41)	2,44
O23	QCKKAWRITPCL	1 (41)	2,44

Nota: Experimento 1 e 2 juntos. Foram isolados e sequenciados 41 fagos. Foram encontrados 23 peptídeos diferentes, o que corresponde à 56 % de variabilidade.

Fonte: A Autora, 2019.

h. N3 se liga especificamente as formas que infectam o hospedeiro vertebrado

Uma vez que o *biopanning* selecionou o clone N3 como o fago que apresentou alta afinidade pelo *T. cruzi*, o peptídeo expresso nesse fago, nomeado de N3, também foi sintetizado um peptídeo com os mesmos aminoácidos do N3 em ordem aleatória (peptídeo *scramble*). Na figura 19 é mostrada a estrutura em 3D predita pelo programa ADC/Labs, onde é possível observar que apesar de ambos os peptídeos apresentarem uma ponte dissulfeto na mesma posição, a diferente ordenação dos aminoácidos altera a estrutura tridimensional.

Figura 19 - Estrutura 3D dos peptídeos N3 e *scramble*

Fonte: A autora, 2019.

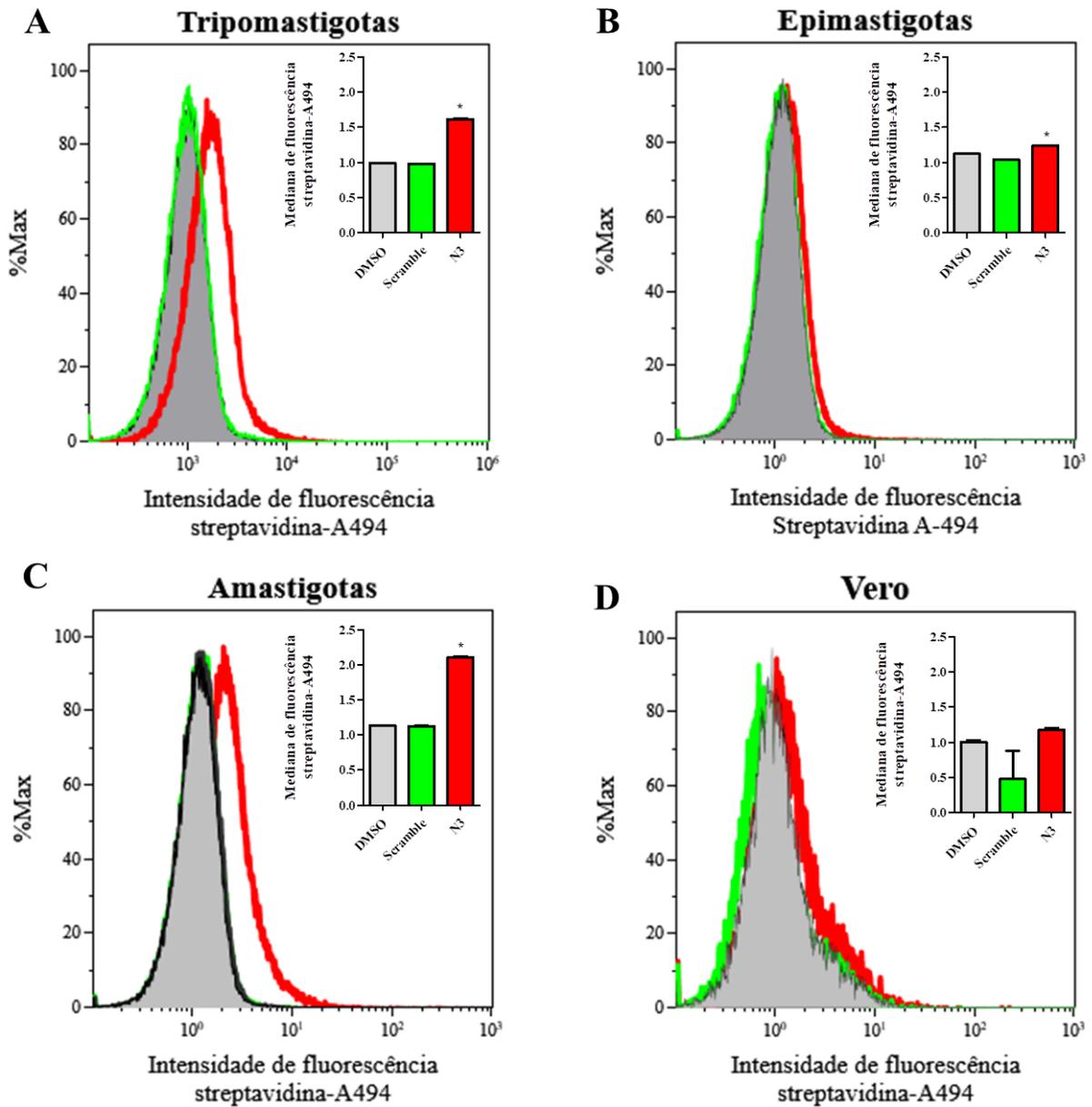
Inicialmente foi avaliado se o peptídeo se liga especificamente ao *T. cruzi* e se apresenta preferência para a forma tripomastigotas. Uma vez que os peptídeos sintetizados são biotinizados, foi utilizado um fluoróforo ligado a streptavidina para detecção do peptídeo.

Como esperado, o peptídeo N3 foi capaz de se ligar às formas tripomastigotas de *T. cruzi* (figura 20A e 21). Surpreendentemente, o peptídeo N3 também reconheceu ligantes na superfície de formas amastigotas de cultura e epimastigotas (figura 20B e 20C), porém nesta última com pouca expressividade.

A especificidade do peptídeo N3 com o *T. cruzi* foi corroborada na figura 20D, em que não houve ligação do peptídeo com células Vero. Além disso, o peptídeo *scramble* não ligou em nenhuma das formas do parasito, evidenciando ainda mais a especificidade de N3 (figura 20 e 21).

Esses resultados demonstram que o peptídeo N3 foi capaz de se ligar ao *T. cruzi* especificamente.

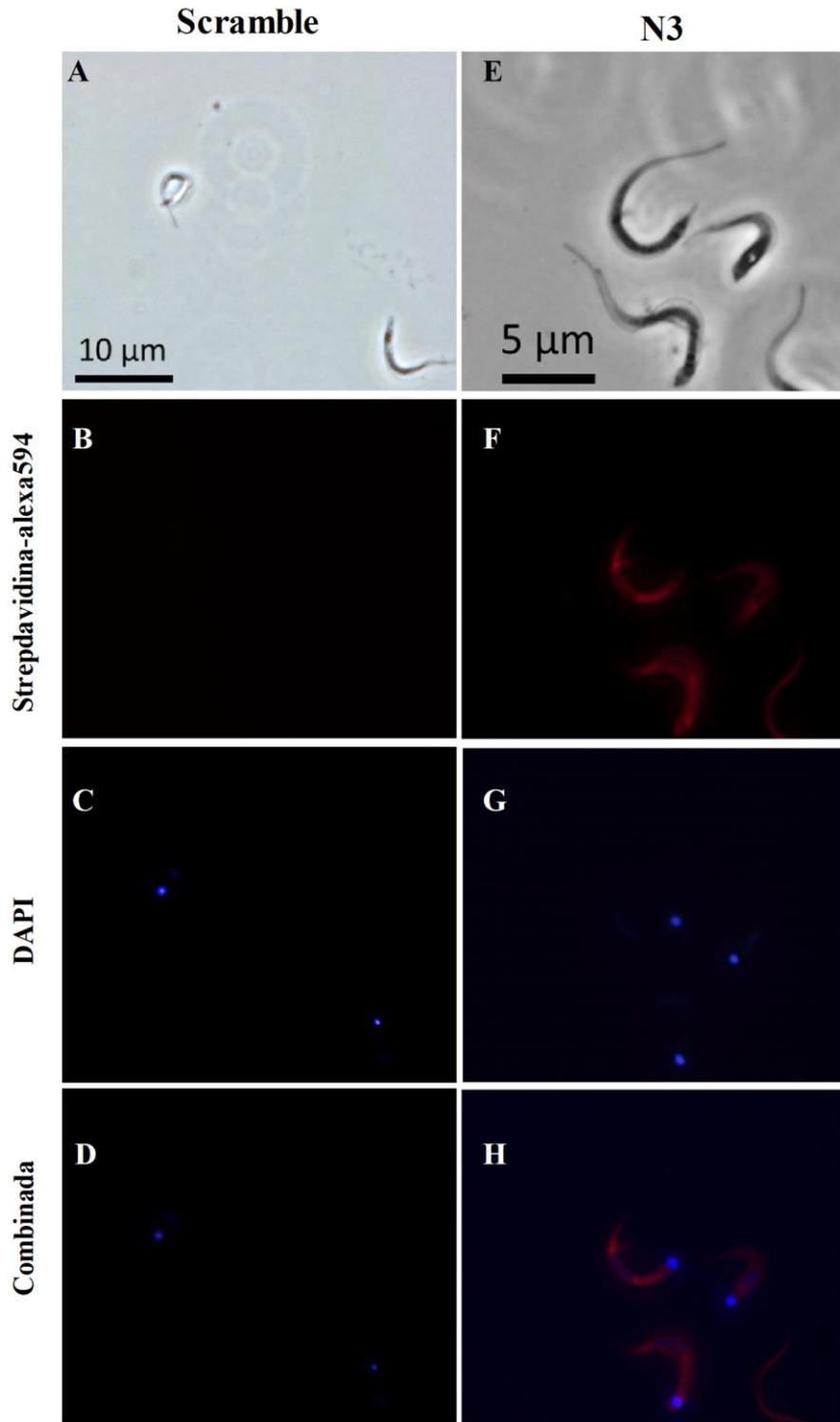
Figura 20 - Ligação do peptídeo N3 no *T. cruzi* e em células Vero



Legenda: (A) Formas Tripomastigotas; (B) Epimastigotas; (C) Amastigotas; (D) células Vero.

Nota: As diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* ou células Vero foram fixadas com 4% de paraformaldeído e incubadas com o peptídeo N3 e *scramble overnight*. Em seguida, o peptídeo ligado foi detectado através de citometria de fluxo. Os *inserts* representam graficamente o histograma. Os dados são representativos de três experimentos independentes. Em * $p < 0.05$ em relação ao grupo DMSO. Análise por One-way Anova, pós teste *Dunnnett*.

Fonte: A autora, 2019.



Legenda: Formas Tripomastigotas tratadas com peptídeo biotilado *scramble* (A-D) ou N3 (E-H). A e E - campo claro com contraste de fase; B e F - Fluorescência da ligação do peptídeo biotilado com a streptavidina-alexa-594; C e G - Fluorescência de DAPI D e H - Fluorescência combinada de DAPI e Streptavidina-Alexa-594.

Nota: Formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram fixadas com 4% de paraformaldeído e incubadas com o peptídeo N3 ou *scramble overnight*. Em seguida, o peptídeo ligado foi detectado através de microscopia de fluorescência.

Fonte: A autora, 2019.

i. N3 reduz a invasão em células Vero

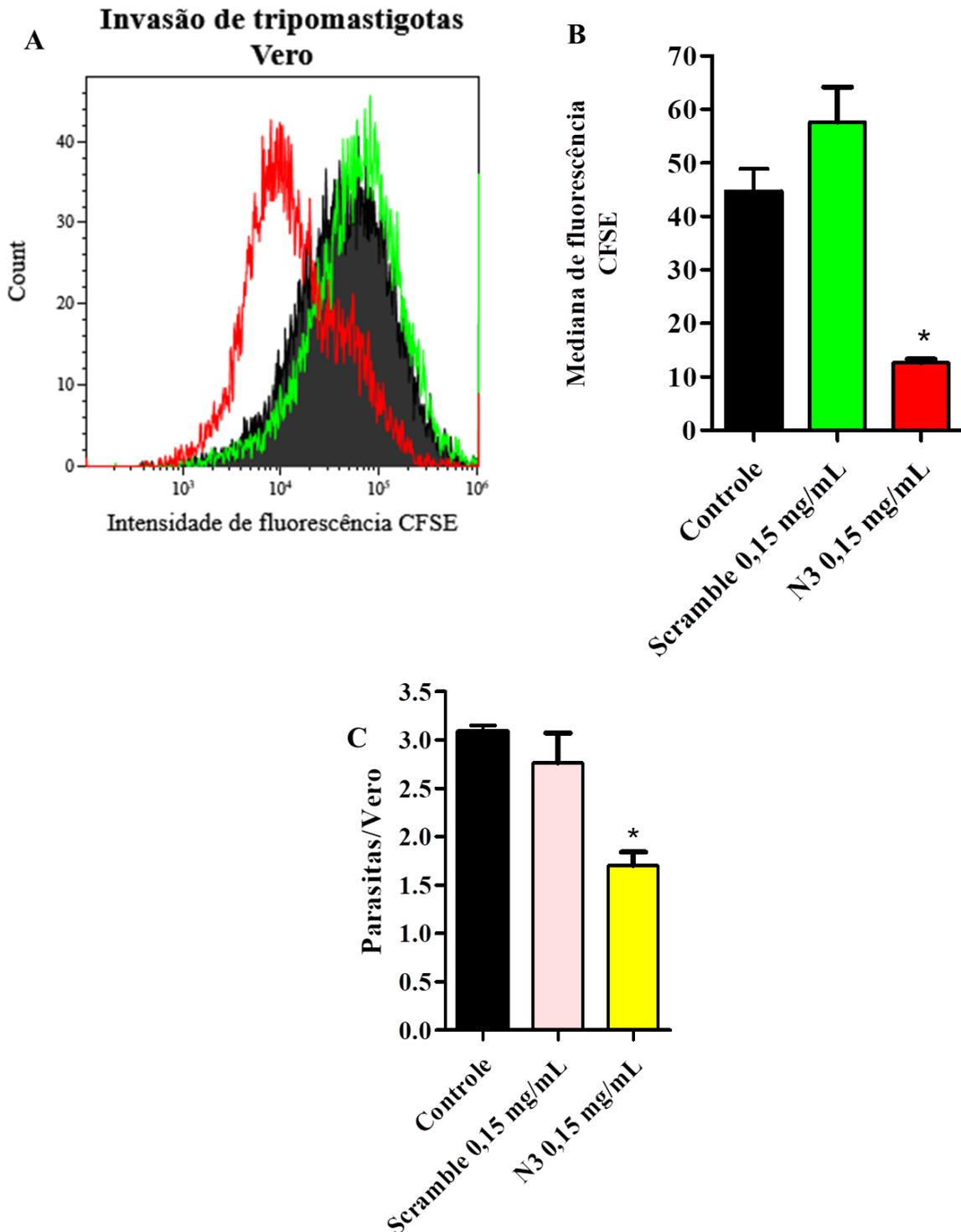
Visto que o peptídeo N3 se ligou nas formas infectivas tripomastigotas, foi questionado se a ligação do peptídeo atrapalha a invasão na célula hospedeira.

Para isso, formas tripomastigotas foram pré incubadas com o peptídeo N3 ou *scramble*. Em seguida, os parasitos foram marcados com CFSE e submetidos a interação com células Vero por 3 horas. Após esse tempo os parasitos livres foram retirados e as células infectadas foram fixadas com paraformaldeído. A invasão foi quantificada através de detecção de parasitos fluorescentes dentro das células Vero por citometria de fluxo e microscópio de fluorescência.

Os resultados do histograma, figura 22A, e o gráfico, 22B, mostram uma redução de 67% da fluorescência nas células Vero infectadas com formas tripomastigotas pré incubadas com o peptídeo N3.

Esses dados são corroborados no microscópio de fluorescência, onde a média de parasitos por célula foi 50% menor no tratamento com o peptídeo N3 (figura 22C).

Figura 22 - N3 reduz a invasão de tripomastigotas em células Vero



Legenda: (A) Histograma de intensidade de fluorescência; (B) Representação gráfica do histograma de A; (C) Quantificação da carga parasitária por microscopia de fluorescência.

Nota: Células Vero foram infectadas com tripomastigotas marcados com CFSE pré incubados com peptídeo N3, *scramble* ou DMSO (controle), após 3 horas de interação, os parasitos livres foram retirados e as células fixadas. Para a citometria de fluxo, as células Vero foram levadas ao citômetro, enquanto que para microscopia as células foram diretamente levadas ao microscópio de fluorescência. O histograma e seu gráfico (A e B) são representativos de três experimentos. Os resultados do gráfico (C) são expressos como média \pm erro padrão de três experimentos independentes. A invasão foi calculada pela média de parasito/Vero. Em $*p < 0,05$ em relação ao controle, análise por One-way Anova, pós teste *Dunnnett*.

Fonte: A autora, 2019.

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novas drogas baseado em um alvo terapêutico reduz a probabilidade de efeitos adversos. Desta maneira, a comunidade científica tende a favorecer essa estratégia. O alvo terapêutico ideal é aquele que é expresso somente no patógeno ou apresenta baixa similaridade com proteínas homólogas do hospedeiro, além de estar envolvido numa atividade essencial para o parasito (Müller *et al.*, 2016).

O *T. cruzi* é um parasito intracelular obrigatório, sendo assim ele necessita entrar na célula hospedeira para prosseguir com seu ciclo de vida. Desta forma as moléculas do parasito envolvidas no processo de invasão celular são essenciais para infecção (Barrias *et al.*, 2010). Dessa maneira, entender o processo de infecção intracelular pode fornecer alvos terapêuticos. Além disso, entender como o *T. cruzi* se relaciona com a célula hospedeira pode guiar o desenvolvimento de novos fármacos.

Os macrófagos constituem uma das primeiras linhas de defesa contra o *T. cruzi* e durante a infecção o parasito é capaz de ativar o *burst* oxidativo destas células. Esse processo envolve a produção de ROS dentro do fagossomo através da ativação da NADPH oxidase. Essa enzima gera o ânion superóxido que pode espontaneamente ou enzimaticamente, através da ação da SOD, ser dismutado a H_2O_2 e O_2 (Groemping e Rittinger, 2005).

O papel das ROS geradas durante o *burst* oxidativo como microbicida foi descrito pela primeira vez em 1968 (Baehner e Karnovsky, 1968). Deste então, esse mecanismo tem sido estudado e caracterizado. Diversos microrganismos são sensíveis a ROS, tais como *Helicobacter pylori* e *Salmonella typhimurium*, evidenciando seu papel na defesa do hospedeiro (Fang *et al.*, 1999; Seyler *et al.*, 2001).

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* entram em contato com ROS geradas pela célula hospedeira no vacúolo e, ainda assim o parasito prossegue com o seu ciclo intracelular. Considerando que as formas tripomastigotas entram em contato com ROS no vacúolo parasitóforo, e que o pH ácido promovido pela fusão com o lisossomo estimula a diferenciação para formas amastigotas, fomos investigar se H_2O_2 , poderia interferir nesta diferenciação (Piacenza e cols., 2009; Alvarez e cols., 2011; Salassa e Romano, 2018). Na figura 9 observamos que o H_2O_2 acelerou a amastigogênese. No entanto, os antioxidantes não enzimáticos utilizados: GSH, NAC e urato não afetaram a diferenciação (figura 10). A enzima que diretamente dismuta o H_2O_2 em oxigênio e água, a catalase (ligada ao polietilenoglicol, PEG, que permite a entrada na célula), reduz discretamente a expressão Ssp4, uma proteína de

superfície específica das formas amastigotas. No entanto, não altera o percentual de formas arredondadas, indicando apenas uma leve influência na diferenciação (figura 11). Em contrapartida, o efeito do H_2O_2 foi corroborado uma vez que, a Peg-Catalase reverteu totalmente o aumento da expressão de Ssp4 e do percentual de formas arredondadas induzidas por esta espécie reativa. No entanto, dentre os antioxidantes utilizados, apenas o urato diminuiu parcialmente o efeito do H_2O_2 (figura 11).

Nosso grupo demonstrou a importância do status redox na diferenciação que ocorre no inseto vetor de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas (Nogueira *et al.*, 2015). Em contrapartida, esses resultados indicam menor destaque para o status redox do ambiente, demonstrando o papel principal do H_2O_2 na primeira diferenciação intracelular do *T. cruzi*. Além disso, esses resultados indicam que geração de H_2O_2 dentro do vacúolo parasitóforo, discutido por Piacenza e colaboradores em 2009, pode acelerar a amastigogênese estimulada pelo pH ácido promovido através da fusão do lisossomo (Salassa e Romano, 2018; Epting *et al.*, 2010; Piacenza, 2009). Nesse contexto, o H_2O_2 liberado durante o *burst* oxidativo poderia regular positivamente a diferenciação das formas tripomastigotas.

A atuação do H_2O_2 como sinalizador para a diferenciação em *T. cruzi* não é contraditório com os dados da literatura. Diferente de outros microrganismos, a morte mediada por ROS do parasito não envolve a produção exclusiva de $O_2^{\cdot-}$ ou H_2O_2 . Essas espécies são tripanocidas em associação com espécies reativas de nitrogênio, o produto dessa reação é o peroxinitrito, e essa espécie reativa de nitrogênio é tóxica para o *T. cruzi* (Alvarez *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2011). Um dos fármacos utilizados para tratamento pelo pacientes portadores da doença de Chagas é o benznidazol. Inicialmente, sua atividade tripanocida era creditada à indução da geração de ROS no parasito. No entanto, o benznidazol não foi capaz gerar ROS em extratos de *T. cruzi*, precisando ser ativada pela ação da nitroredutase tripanossomal I. Em seguida, ocorre uma ligação covalente da droga com grupos tióis reduzidos e a geração de adutos glioxal tóxicos (revisado por Paiva *et al.*, 2018). Além disso, o tratamento de macrófagos com benznidazol, um dos fármacos usados na terapia chagásica, não interferiu na produção de ROS pela Nox, sendo sua ação relacionada com a inibição da ativação de NF κ B que reduz a produção de NO e das citocinas pró-inflamatórias (Manarin *et al.*, 2010).

O H_2O_2 tem sido implicado na diferenciação de diversos tipos de células. Em 2009, Xiao demonstrou que o H_2O_2 desencadeia a diferenciação de células tronco embrionárias em células musculares lisas (Xiao *et al.*, 2009). O H_2O_2 também foi capaz de induzir a diferenciação de adipócitos em células troncos mesenquimais (Huang *et al.*, 2018).

Em células tumorais já foi descrito o papel do H₂O₂ na tumorigênese, como por exemplo em células leucêmicas promielocítica HL-60, nas quais as ROS induz a diferenciação nestas células (Lin e Wang, 2012).

ROS também estão envolvidas na diferenciação de macrófagos em osteoclastos (osteoclastogênese) induzida pelo ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL, do inglês, *receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand*). Nesse modelo, ROS é essencial para que ocorra a diferenciação, onde a inibição da Nox impede este processo (Lee *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Sasaki *et al.*, 2009).

O envolvimento de ROS também é observado nos processos de diferenciação de tripanossomatídeos. Em *Trypanosoma brucei*, a diferenciação de formas tripomastigotas alongadas proliferativas para as formas tripomastigotas *stumpy* quiescente é influenciada por ROS. A adição de H₂O₂ estimula a diferenciação através da fosforilação da cinase $\alpha 1$ ativada por AMP (AMPK $\alpha 1$, do inglês, *AMP-activated kinase $\alpha 1$*) (Saldivia *et al.*, 2016). Em *Leishmania amazonensis* a adição de H₂O₂ desencadeia a diferenciação de formas promastigotas para as formas amastigotas (Mittra *et al.*, 2013).

Um dos mecanismos pelo qual H₂O₂ pode atuar como segundo mensageiro na sinalização redox é através da oxidação reversível de resíduos de cisteína de proteínas cinases e fosfatases (Case, 2017). Além disso, a análise fosfoproteômica durante a amastigogênese *in vitro* mostrou que ocorre uma modulação de eventos de fosforilação, o que evidencia o papel de cinases e fosfatases (Queiroz *et al.*, 2014). De fato a sinalização a favor da diferenciação promovida por H₂O₂ foi dependente da atividade de PP2A (figura 12A). Observamos que o tratamento com H₂O₂ aumentou a atividade serina e treonina fosfatase (figura 12B), corroborando o papel desta enzima na sinalização do H₂O₂.

A ação de H₂O₂ na atividade de PP2A é contraditória. Alguns estudos demonstram que o ROS inibe a atividade da PP2A (Chen *et al.*, 2008; Nakahata e Morishita, 2014). Outros estudos mostram o contrário, demonstram que ROS pode promover ativação da enzima (Cicchillitti *et al.*, 2003; Sheth *et al.*, 2009).

PP2A está relacionada com a osteoclastogênese induzida por RANKL. Foi observado que a redução da expressão de PP2A diminuiu a expressão de RANKL e consequentemente a osteoclastogênese induzida por ROS (Okamura *et al.*, 2013). Além da osteoclastogênese, a enzima PP2A está envolvida em outros processos de diferenciação, tais como, inibição da diferenciação embrionária tumoral e de células leucêmicas, e a indução da diferenciação de células neuronais. (Benes *et al.*, 2007; Nishina *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1995).

A amastigogênese *in vitro* de *T. cruzi* induzida por pH ácido é acompanhada por aumento transiente de produção de H₂O₂ (figura 13). Essa característica confirma o papel sinalizador do H₂O₂ (Antunes e Brito, 2017). Esse mesmo fenômeno é observado durante a morfogênese, que ocorre ao longo do desenvolvimento embrionário de peixe-zebra (Gauron *et al.*, 2016). De forma similar, durante a diferenciação induzida pelo ácido retinóico de células embrionárias tumorais de camundongos F9 ocorre a produção de ROS (Dickson *et al.*, 2017). O H₂O₂ pode ser formado pela dismutação enzimática pela ação da superóxido dismutase. O *T. cruzi* apresenta exclusivamente a SOD dependente de ferro. Dentre as isoformas descritas, avaliamos a expressão mitocondrial (Fe-SODA) e citosólica (Fe-SODB). Embora a literatura tenha sugerido a importância de Fe-SODB na infecção intracelular (Martinez *et al.*, 2014), observou-se pelos resultados da figura 14 que apenas a isoforma mitocondrial é modulada durante o processo de diferenciação induzida por pH ácido.

Em *Leishmania*, a ativação de Fe-SOD bem como o H₂O₂ desencadeia a diferenciação de formas promastigotas para as formas amastigotas (Mittra *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2018).

Considerando o aumento da expressão de Fe-SODA e sua importância para um possível balanço redox mitocondrial, investigou-se a função mitocondrial durante a amastigogênese. Nossos dados demonstram que a mitocôndria reduz funcionalmente durante a amastigogênese. Após 1 hora de estímulo à diferenciação, ocorre a redução da capacidade fosforilativa (figura 16) e perda do $\Delta\Psi_m$ (tabela 3). Essa disfunção é acompanhada pelo aumento da produção de ROS (figura 13). Nesse cenário, o qual ocorre a disfunção mitocondrial acompanhada pela perda do potencial mitocondrial sugere que o estímulo ácido induziu a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP), uma vez que são características descritas para tal evento (Kuznetsov *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2017). Nossos resultados da figura 18 corroboram que as ROS observadas após 60 minutos de indução são provenientes da mitocôndria, uma vez que um antioxidante mitocondrial, mitoTEMPO, inibiu esse aumento. Além disso, testamos uma baixa concentração do inibidor de mPTP, a ciclosporina, e novamente não foi observado o aumento na produção de H₂O₂ após 60 minutos em DMEM pH 5,0.

Na diferenciação de *Leishmania* em pH ácido também é observada a geração de ROS mitocondrial, porém diferentemente do observado nesse trabalho, o ROS é proveniente da cadeia de elétrons, com aumento do consumo de oxigênio e hiperpolarização mitocondrial. Nesse contexto, foi demonstrado o papel central da isoforma mitocondrial de SOD de *Leishmania* para manutenção redox mitocondrial e produção de H₂O₂ como molécula sinalizadora para a diferenciação (Mittra *et al.*, 2013; Mittra *et al.*, 2016; Mittra *et al.*, 2017).

Diferentemente, nossos resultados indicam que em *T. cruzi* o ROS mitocondrial produzido durante a diferenciação pode ser proveniente da abertura do mPTP ao invés da cadeia de transporte de elétrons.

Foi descrito em formas epimastigotas de *T. cruzi* que altas doses de H₂O₂ (5 mM) foi capaz de abrir o mPTP (Bustos *et al.*, 2015). A superexpressão da ciclofilina D, um dos componentes do mPTP, acentuou a perda de potencial mitocondrial (Bustos *et al.*, 2017). No entanto, o trabalho usou elevadas concentrações de H₂O₂, que causa o estresse oxidativo e leva o parasito à morte. No nosso trabalho utilizamos uma baixa concentração de H₂O₂ (100 vezes menor) o que pode promover a abertura mPTP de forma transiente e que não sinalize para morte.

Existem dois mecanismos sugeridos de abertura do mPTP, o primeiro mecanismo consiste na abertura irreversível do poro com permeabilidade permanente, levando a morte celular ou, uma segunda estratégia em que abertura do poro é transiente, reversível e não leva à morte. Nesse último, o mPTP participaria de processos fisiológicos relacionados com regulação de cálcio citosólico e produção de energia (revisado por Pérez e Quintanilla, 2017). A abertura transiente do mPTP tem sido associada a sinalização mediada por ROS (Zorov *et al.*, 2000).

Usualmente, associa-se o mPTP à indução da morte celular e patogênese. Mas tem-se observado o papel da mPTP na diferenciação de cardiomiócitos e de células neuronais. Em cardiomiócitos, a abertura/fechamento do mPTP controla a diferenciação. Os cardiomiócitos em estágios de desenvolvimento com o mPTP aberto, com baixo $\Delta\Psi_m$ e altos níveis de ROS, se diferenciam para cardiomiócitos maduros através do fechamento do mPTP (Hom *et al.*, 2011). Diferentemente do que ocorre nos cardiomiócitos, células progenitoras neurais se diferenciam em neurônios (neurogênese) através de ROS gerados pela abertura de mPTP (Hou *et al.*, 2013). Nesse contexto, o processo de amastigogênese do *T. cruzi* pode se assemelhar com o processo de neurogênese.

Em mamíferos, PP2A juntamente com o PTEN sustentam a transferência de íons de cálcio entre o retículo endoplasmático e a mitocôndria. O aumento da concentração de íons de cálcio na mitocôndria provido do retículo endoplasmático é um dos principais indutores de abertura do mPTP (Bonora e Pinton, 2014). Em adição, o polifosfato inorgânico é um potente ativador da abertura de mPTP induzida por íons de cálcio (Seidlmayer *et al.*, 2012).

A ativação da PI-PLC durante a amastigogênese de *T. cruzi* sugere a importância da liberação dos íons de cálcio dos estoques intracelulares (Okura *et al.*, 2005). Além disso, o aumento dos níveis de polifosfato intracelular é observado durante a diferenciação de formas

tripomastigotas para amastigotas em meio ácido (Ruiz *et al.*, 2001). Nesse contexto, a liberação de íons cálcio e a presença de polifosfato podem contribuir para a abertura do mPTP durante a amastigogênese.

Os resultados obtidos nesta tese a partir dos estudos da participação de ROS na amastigogênese de *T. cruzi* indicam a capacidade do parasito em adaptar-se ao ambiente. Em conjunto, estes resultados indicam que durante a amastigogênese no fagolisossomo ocorre a produção transiente de H_2O_2 pelo *T. cruzi*. Em paralelo, a indução da diferenciação para as formas amastigotas reduz funcionalmente a mitocôndria, que perde o potencial de membrana e a capacidade fosforilativa, sugerindo a abertura do mPTP. Essa abertura pode gerar espécies reativas de oxigênio, como $O_2^{\cdot-}$, que é contrabalaneada pela expressão de Fe-SODA. Desta forma, o H_2O_2 produzido não somente é menos danoso para o parasito bem como pode atuar no favorecimento da amastigogênese por um via que perpassa uma serina/treonina fosfatase.

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo. No hospedeiro vertebrado, para o sucesso da infecção o parasito precisa invadir a célula hospedeira e estabelecer a infecção intracelular. Nossos resultados mostraram que o parasito se favorece de ROS para sua diferenciação intracelular (figuras 9-18), o que evidencia a sua capacidade de adaptação a variações do ambiente, tais como o pH e o ROS gerado no fagolisossomo (Piacenza *et al.*, 2009). Essa plasticidade do parasito é uma das características que dificulta o desenvolvimento de novas drogas e de vacinas. Portanto, a combinação de diferentes estratégias a fim de identificar novos alvos terapêuticos torna-se fundamental. Com esse intuito, outra abordagem utilizada no trabalho foi o uso da técnica de *phage display*, como ferramenta para descobrir peptídeos que possam impedir a invasão da célula hospedeira. Para isso, utilizamos essa técnica para varrer a superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi* mantidos em cultura. Esta tecnologia permite a identificação e isolamento de ligantes ao receptor (Koivunen *et al.*, 1999).

O *T. cruzi* é capaz de invadir diversos tipos de células, fagocíticas e não fagocíticas. As formas tripomastigotas são as formas classicamente infectivas, no entanto é descrita a invasão de células do hospedeiro vertebrado por formas amastigotas. O *T. cruzi* se utiliza de diversos mecanismos e moléculas de superfície para entrada na célula hospedeira. Ressalta-se que esses diferentes mecanismos de entrada acontecem simultaneamente durante a infecção no hospedeiro pelo parasito. Uma vez que o parasito necessita entrar na célula hospedeira para completar seu ciclo de vida e disseminar a infecção, o sucesso desta etapa é essencial e interesse no estudo de novos alvos terapêuticos (Revisado por Walker *et al.*, 2014).

Em tripanossomatídeos a técnica de *phage display* tem sido aplicada para diferentes abordagens. Em *T. brucei*, o *phage display* foi usado para buscar mimetopos da glicoproteína variante de superfície (VSG). Esses mimetopos são importantes para diagnóstico da doença pelo teste de detecção de anticorpo (Van Nieuwenhove *et al.*, 2011; Van Nieuwenhove *et al.*, 2012). Em *Leishmania*, a técnica foi utilizada para o desenvolvimento de vacinas. Para este fim, o soro de pacientes com leishmaniose tegumentar (infecção por *Leishmania amazonensis*) ou leishmaniose visceral (infecção por *Leishmania infantum*) foram utilizados para o *biopanning*. Os peptídeos selecionados foram imunogênicos, induzindo específica resposta *T helper* 1 (Th-1) (Carvalho *et al.*, 2019; Ramos *et al.*, 2017).

Em *T. cruzi*, o *phage display* contribuiu para elucidar a interação de glicoproteínas da família trans-sialidase/gp85 com as células de hospedeiros mamíferos. Neste contexto, o uso de fagos expressando FLY (um peptídeo motif da trans-sialidase/gp85) demonstrou a participação da enzima na interação com células endoteliais. Além disso, foi identificado um novo *motif* importante da trans-sialidase/gp85 (TS9) e o receptor na célula hospedeira que liga a gp85, o prokineticin-2 receptor (PKR2) (Tonelli *et al.*, 2010; Khusal *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2015). No entanto, a técnica ainda não foi utilizada para identificação de novas moléculas de superfície do parasito, que participam do processo de invasão na célula hospedeira.

No nosso trabalho usamos uma biblioteca de fagos que obteve sucesso em plasmodium, conseguindo identificar uma gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (GAPDH). Os peptídeos expressos nessa biblioteca são compostos por 12 aminoácidos fusionadas a proteína VIII (XCXXXXXXXXCX), onde X é qualquer aminoácido e C é a cisteína. Vale ressaltar que as duas cisteínas presentes no peptídeo se ligam formando um *looping* (Cha *et al.*, 2016).

Nós identificamos dois clones, N3 e N1, com aparente afinidade com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* após a terceira rodada de seleção. Os dois representaram mais que 80% dos fagos selecionados no primeiro experimento (tabela 4). Considerando que a complexidade inicial da biblioteca era de 10^9 peptídeos randômicos, encontrar um mesmo fago mais de uma vez após a seleção sugere uma especificidade do fago. O clone N3 foi o clone mais frequente e o único encontrado nos dois experimentos realizados (tabela 5), sugerindo fortemente a sua capacidade de ligação nas formas tripomastigotas e por isso escolhido para os ensaios de ligação e infecção em células Vero. O fato do clone N3 ter sido escolhido para os outros experimentos, não descarta a possibilidade do clone N1 afetar a invasão do *T. cruzi*.

Os peptídeos randômicos expressos em biblioteca de fagos podem ser divididos em três grandes categorias: peptídeos que não ligam no alvo, peptídeos que ligam ou não especificamente no alvo. A maioria dos clones expressa os peptídeos que não ligam no alvo, diferentemente dos que expressam peptídeos com alta afinidade, que são poucos (Lindner *et al.*, 2011). Um dos grandes problemas recorrentes do biopanning é a seleção de peptídeos não relacionados ao alvo (TUP), em que os peptídeos recuperados não têm afinidades com o alvo (Bakhshinejad *et al.*, 2016).

O peptídeo N3 não foi um TUP, uma vez que não se ligou nas células de mamífero Vero (figura 20D) e nas formas não infectivas epimastigotas de *T. cruzi* (figura 20B). Contrariamente, o peptídeo N3 se ligou nas formas infectivas tripomastigotas (figura 20A e 21) e também nas formas amastigotas extracelulares (figura 20C). Nota-se que esta última forma, apesar de classicamente ser conhecida como forma replicativa, apresenta a capacidade de infectar e estabelecer a infecção intracelular (Lima *et al.*, 2010, Salassa e Romano, 2018). Sendo assim, sugere-se que o peptídeo se liga em alguma molécula de superfície em comum entre as duas, e que possivelmente está envolvida com a infecção no hospedeiro vertebrado, uma vez que não se ligou em formas não infectivas.

Confirmou-se que o peptídeo N3 reduziu significativamente a infecção em células Vero (figura 22). Esse resultado foi confirmado uma vez que o peptídeo *scramble* que não se ligou ao *T. cruzi* e também não interferiu na invasão dessas formas na célula de mamífero. A ausência de atividade do peptídeo *scramble* reforça a importância da estrutura formada pelo peptídeo N3 para o efeito, pois apesar de conterem os mesmos aminoácidos, ambos diferem no arranjo estrutural (figura 19).

Usualmente, os ligantes dos peptídeos selecionados por bibliotecas de peptídeos randômicos tendem a ser direcionados a sítios biologicamente relevantes na superfície do alvo (Molek *et al.*, 2011).

A superfície das formas tripomastigotas é coberta principalmente por glicoconjugados ancorados por glicofosfatidilinositol. Dentre esses destaca-se a família transialidase/gp85 e mucinas. As transialidasas são enzimas que catalisam a transferência de ácido siálico do hospedeiro para o parasito. Essas enzimas interagem tanto com os receptores da célula hospedeira quanto com a matriz, e estão envolvidas na infecção (Carvalho *et al.*, 2010; Giordano *et al.*, 1994; Lieke *et al.*, 2011; Ming *et al.*, 1993). As mucinas apresentam o ácido siálico na sua estrutura e são um dos principais componentes do glicocálice do parasito e são capazes de interagir com as células de mamíferos (Buscaglia *et al.*, 2006; Jacobs *et al.*, 2010).

Considerando que as moléculas de superfície do parasito normalmente desempenham o papel na interação com o hospedeiro, bem como, que a técnica de *phage display* seleciona alvos bioativos, é comum esperar que o peptídeo N3 reduza a infecção por se ligar provavelmente à uma glicoproteína de superfície do parasito que esteja envolvida na infecção.

O peptídeo N3 não foi capaz de inibir totalmente a entrada na célula Vero. Esse resultado pode ser devido ao fato do *T. cruzi* utilizar diversos mecanismos para entrar célula hospedeira (Barrias *et al.*, 2013). Nesse contexto, o peptídeo N3 foi capaz de inibir apenas um destes, se ligando a uma das famílias de glicoproteínas expressas na superfície do parasito.

Os peptídeos isolados através da técnica de *phage display* podem ser promissores e usados na clínica. Alguns peptídeos provenientes desta técnica vêm sendo usados para o tratamento de doenças. Como exemplo temos o Ecallantide é um inibidor de serina protease que vem sendo usado para o tratamento de angioderma hereditário (Farkas e Varga, 2011). O Romiplostim (Nplate[®]) é um agonista do receptor de trombopoetina usado no tratamento de trombocitopenia (revisado por Keating, 2012). Outro exemplo é o Tanzeum (albigutide), um agonista do receptor peptídeo semelhante a glucagon usado no tratamento da diabetes mellitus 2.

Os resultados obtidos por *phage display* identificaram o peptídeo N3 como ligante na superfície de tripomastigotas capaz de inibir a entrada do mesmo na célula hospedeira. Estudos futuros podem levar a identificação da molécula alvo na superfície de *T. cruzi* e assim contribuir para a descoberta de um novo alvo terapêutico ou a corroboração de um existente.

CONCLUSÕES

Nossos resultados abordaram duas etapas da infecção intracelular do *T. cruzi* importantes para o controle da doença. Em relação a etapa inicial de invasão da célula hospedeira foi identificado um peptídeo capaz de reduzir este processo, o N3, sugerindo um alvo molecular na superfície do parasito. Por outro lado, demonstrou-se a importância do peróxido de hidrogênio na indução da amastigogênese, etapa intermediária da infecção intracelular. Além disso, os resultados demonstraram a importância da fisiologia mitocondrial do parasito na diferenciação das formas tripomastigotas para amastigotas em hospedeiros mamíferos.

REFERÊNCIAS

- Abad-Franch F, Diotaiuti L, Gurgel-Gonçalves R, Gurtler RE. Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: cui bono?. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108, (2):251-254.
- Abad-Franch F.; Monteiro F.A. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 30, (102 Suppl 1): 57-70.
- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW. The revised classification of eukaryotes. J Eukaryot Microbiol. 2012 Sep;59(5):429-93.
- Albertti LA, Macedo AM, Chiari E, Andrews NW, Andrade LO. Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development. Microbes Infect. 2010;12(10):784–789.
- Almeida-de-Faria M, Freymüller E, Colli W, Alves MJ..*Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. Exp Parasitol. 1999; 92: 263-274.
- Alvarez MN, Piacenza L, Irigoín F, Peluffo G, Radi R. Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*. Arch Biochem Biophys. 2004; 432: 222–232.
- Alvarez, MN, Peluffo, G, Piacenza L, Radi R. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. J Biol Chem. 2011; 286: 6627–6640.
- Alves, M.J.M.; Colli, W. Signaling Pathways in *Trypanosoma cruzi* that Modulate Host Cell Interaction. Open Parasitol. J., 2010, (4), 77-83.
- Anderson AC. The process of structure-based drug design. Chem Biol. 2003;10(9):787-97.
- Andrade LO e Andrews NW. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. J Exp Med. 2004; 200: 1135–1143.
- Andrade SG, Campos RF, Steindel M, Guerreiro ML, Magalhães JB, Almeida MC, Reis JN, Santos VC, Valadares HM, Reis MG, Macedo AM. Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensus (2009). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011; 106(8):948-56.

Andrews NW, Abrams CK, Slatin SL, Griffiths GA. *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell*. 1990; 61: 1277–1287.

Andriani G, Chessler AD, Courtemanche G, Burleigh BA, Rodriguez A. Activity in vivo of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds selected from a high throughput screening. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(8):e1298.

Antunes F, Brito PM. Quantitative biology of hydrogen peroxide signaling. *Redox Biol*. 2017; 13:1-7.

Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol*. 2014;5:196.

Avdonin PV, Nadeev AD, Mironova GY, Zharkikh IL, Avdonin PP, Goncharov NV. Enhancement by Hydrogen Peroxide of Calcium Signals in Endothelial Cells Induced by 5-HT1B and 5-HT2B Receptor Agonists. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 ; 1701478.

Baehner RL, Karnovsky ML. Deficiency of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide oxidase in chronic granulomatous disease. *Science*. 1968;162(3859):1277–9.

Bakhshinejad, B., Zade, H. M., Shekarabi, H. S. & Neman, S. Phage display biopanning and isolation of target-unrelated peptides: in search of nonspecific binders hidden in a combinatorial library. *Amino Acids*. 2016; 48, 2699–2716.

Barclay JJ, Morosi LG, Vanrell MC, Trejo EC, Romano PS, Carrillo C. *Trypanosoma cruzi* Coexpressing Ornithine Decarboxylase and Green Fluorescence Proteins as a Tool to Study the Role of Polyamines in Chagas Disease Pathology. *Enzyme Res*. 2011:657460

Barreto de Albuquerque J, Silva Dos Santos D, Stein JV, de Meis J. Oral Versus Intra-gastric Inoculation: Similar Pathways of *Trypanosoma cruzi* Experimental Infection? From Target Tissues, Parasite Evasion, and Immune Response. *Front Immunol*. 2018; 27;9:1734.

Barrett MP e Croft SL. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Br Med Bull*. 2012; 104: 175-196.

Barrias ES, de Carvalho TM, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Front Immunol*. 2013; 4:186.

Barrias ES, Dutra JM, De Souza W, Carvalho TM. Participation of macrophage membrane rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 363: 828–834.

Barrias ES, Reignault LC, De Souza W, Carvalho TM. Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages. *PLoS One*. 2010; 5(1):e7764.

Barros MV, Rocha MO, Ribeiro AL, Machado FS. Doppler tissue imaging to evaluate early myocardium damage in patients with undetermined form of Chagas' disease and normal echocardiogram. *Echocardiography*. 2001; 18(2):131-6.

Baskaran R, Velmurugan BK. Protein phosphatase 2A as therapeutic targets in various disease models. *Life Sci*. 2018; 210:40-46.

Baxter A, Mittler R, Suzuki N. ROS as key players in plant stress signalling. *J Exp Bot*. 2014; 65(5):1229-40.

Benes P, Macecková V, Zatloukalová J, Kovárová L, Smardová J, Smarda J. Retinoic acid enhances differentiation of v-myb-transformed monoblasts induced by okadaic acid. *Leuk Res*. 2007; 31(10):1421-31.

Boisnard S, Lagniel G, Garmendia-Torres C, Molin M, Boy-Marcotte E, Jacquet M, Toledano MB, Labarre J, Chédin S. H₂O₂ activates the nuclear localization of Msn2 and Maf1 through thioredoxins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. 2009 ;8(9):1429-38

Bonney KM, Luthringer DJ, Kim SA, Garg NJ, Engman DM. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annu Rev Pathol*. 2018.

Bonnycastle LL, Mehroke JS, Rashed M, Gong X, Scott JK. Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. *J Mol Biol*. 1996; 258:747-762

Bonora M, Pinton P. The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death. *Front Oncol*. 2014; 4:302.

Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol*. 2010; 45(7-8):466-72.

Buckner FS, Verlinde CL, La Flamme AC, Van Voorhis WC. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40: 2592-2597.

Buscaglia CA, Campo VA, Frasch AC, Di Noia JM. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol*. 2006; 4(3):229-36.

Bustos PL, Perrone AE, Milduburger N, Postan M, Bua J. Oxidative stress damage in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is inhibited by Cyclosporin A. *Parasitology*. 2015; 142(8):1024-32.

Bustos PL, Volta BJ, Perrone AE, Mildubegger N, Bua J. A homolog of cyclophilin D is expressed in *Trypanosoma cruzi* and is involved in the oxidative stress-damage response. *Cell Death Discov.* 2017; 3:16092.

Caler EV, Chakrabarti S, Fowler KT, Rao S, Andrews NW. The Exocytosis-regulatory protein synaptotagmin VII mediates cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med.* 2001; 193(9):1097-104.

Cámara MLM, Cánepa GE, Lantos AB, Balouz V, Yu H, Chen X, Campetella O, Mucci J, Buscaglia CA. The Trypomastigote Small Surface Antigen (TSSA) regulates *Trypanosoma cruzi* infectivity and differentiation. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(8):e0005856.

Campos VL, Martins-Teixeira MB, Carvalho I. *Trypanosoma cruzi* Invasion into Host Cells: A Complex Molecular Targets Interplay. *Mini Rev Med Chem.* 2016; 16(13):1084-97.

Canavaci AM, Bustamante JM, Padilla AM, Perez Brandan CM, Simpson LJ, Xu D, Boehlke CL, Tarleton RL. In vitro and in vivo high-throughput assays for the testing of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(7):e740.

Carbajal de la Fuente AL, Porcasi X, Noireau F, Diotaiuti L, Gorla DE. The association between the geographic distribution of *Triatoma pseudomaculata* and *Triatoma wygodzinskyi* (Hemiptera: *Reduviidae*) with environmental variables recorded by remote sensors. *Infect Genet Evol.* 2009; 9(1): 54-61.

Cardoso EJ, Valdéz GC, Campos AC, de la Luz Sanchez R, Mendoza CR, Hernández AP, Ramírez MH, Habana JR, González EB, Matzumura PD, Carlier Y. Maternal fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*: a problem of public health little studied in Mexico. *Exp Parasitol.* 2012 ; 131(4):425-32.

Carvalho GB, Costa LE, Lage DP, Ramos FF, Santos TTO, Ribeiro PAF, Dias DS, Salles BCS, Lima MP, Carvalho LM, Dias ACS, Alves PT, Franklin ML, Silva RAM, Duarte MC, Menezes-Souza D, Roatt BM, Chávez-Fumagalli MA, Goulart LR, Teixeira AL, Coelho EAF. High-through identification of T cell-specific phage-exposed mimotopes using PBMCs from tegumentary leishmaniasis patients and their use as vaccine candidates against *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology.* 2019; 146(3):322-332.

Carvalho ST, Sola-Penna M, Oliveira IA, Pita S, Gonçalves AS, Neves BC, Sousa FR, Freire-de-Lima L, Kurogochi M, Hinou H, Nishimura S, Mendonça-Previato L, Previato JO, Todeschini AR. A new class of mechanism-based inhibitors for *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and their influence on parasite virulence. *Glycobiology.* 2010; 20(8):1034-45.

Case AJ. On the Origin of Superoxide Dismutase: An Evolutionary Perspective of Superoxide-Mediated Redox Signaling. *Antioxidants (Basel).* 2017; 6(4).

Cazorla, S.I.; Frank, F.M.; Becker, P.D.; Arnaiz, M.; Mirkin, G.A.; Corral, R.S.; Guzman, C.A.; Malchiodi, E.L. Redirection of the Immune Response to the Functional Catalytic Domain of the Cystein Proteinase Cruzipain Improves Protective Immunity against *Trypanosoma cruzi* Infection. *J. Infect. Dis.*, 2010, 202(1), 136-144.

Cha SJ, Kim MS, Pandey A, Jacobs-Lorena M. Identification of GAPDH on the surface of Plasmodium sporozoites as a new candidate for targeting malaria liver invasion. J Exp Med. 2016; 213(10):2099-112.

Chagas, C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1909; 1, 159-218.

Chakrabarti S1, Andrade LO, Andrews NW. *Trypanosoma cruzi* invades synaptotagmin VII-deficient cells by a PI-3 kinase independent pathway. Mol Biochem Parasitol. 2005; 141(1):125-8.

Chatelain E. Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. J Biomol Screen. 2015; 20(1):22-35.

Chen K, Kirber MT, Xiao H, Yang Y, Keaney JF Jr. Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. J Cell Biol. 2008; 181(7): 1129-1139.

Choi JY, Roush WR. Structure Based Design of CYP51 Inhibitors. Curr Top Med Chem. 2017; 17(1):30-39.

Cicchillitti L, Fasanaro P, Biglioli P, Capogrossi MC, Martelli F. Oxidative stress induces protein phosphatase 2A-dependent dephosphorylation of the pocket proteins pRb, p107, and p130. J Biol Chem. 2003; 278(21):19509-17.

Colantonio LD, Prado N, Segura EL, Sosa-Estani S. Electrocardiographic Abnormalities and Treatment with Benznidazole among Children with Chronic Infection by *Trypanosoma cruzi*: A Retrospective Cohort Study. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10(5):e0004651.

Costa J. Distribution and characterization of different populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Tritominae). 2000; Cad Saude Publica. 2000; 16(2): 93-95.

Coura JR e Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide. Nature. 2010; 465: S6-S7.

Coura JR, Junqueira AC, Ferreira JMB. Surveillance of seroepidemiology and morbidity of Chagas disease in the Negro River, Brazilian Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018; 113(1):17-23.

Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas' disease in Amazonian Brazil. Trends Parasitol. 2002; 18(4): 171-176.

Coura JR, Viñas PA, Junqueira AC. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014; 109(7):856-62.

Coura JR. Síntese das doenças infecciosas e parasitárias. Guanabara Koogan, 2008.

Croston GE. The utility of target-based discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2017; 12(5):427-429.

De Bona E, Lidani KCF, Bavia L, Omidian Z, Gremski LH, Sandri TL, de Messias Reason IJ. Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy?. *Front Immunol.* 2018; 9:1842.

de la Rosa, E., Paglini-Oliva, P., Prato, L. B., Benizio, E., Triquell, M. F., Muñoz, S. E., Fernández, E. A. Early Detection of Chronic Asymptomatic Chagas Infection. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research.* 2018. 24, 4567-4571.

de Souza W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des.* 2002; 8: 269-285.

Díaz MV, Miranda MR, Campos-Estrada C, Reigada C, Maya JD, Pereira CA, López-Muñoz R. Pentamidine exerts in vitro and in vivo anti *Trypanosoma cruzi* activity and inhibits the polyamine transport in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 2014; 134:1-9.

Dickson BJ, Gatie MI, Spice DM, Kelly GM. NOX1 and NOX4 are required for the differentiation of mouse F9 cells into extraembryonic endoderm. *PLoS One.* 2017; 12(2):e0170812.

Diebold L, Chandel NS. Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. *Free Radic Biol Med.* 2016; 100:86-93.

Diniz LF, Mazzeti AL, Caldas IS, Ribeiro I, Bahia MT. Outcome of E1224-Benznidazole Combination Treatment for Infection with a Multidrug-Resistant *Trypanosoma cruzi* Strain in Mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 25:62(6). pii: e00401-18.

Domínguez L, Sosa-Peinado A, Hansberg W. Catalase evolved to concentrate H₂O₂ at its active site. *Arch Biochem Biophys.* 2010; 500(1):82-91.

Dufernez F, Yernaux C, Gerbod D, Noël C, Chauvenet M, Wintjens R, Edgcomb VP, Capron M, Opperdoes FR, Viscogliosi E. The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in trypanosomatidae: characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40(2):210-25.

Dulgerian LR, Garrido VV, Stempin CC, Cerbán FM. Programmed death ligand 2 regulates arginase induction and modifies *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages during murine experimental infection. *Immunology.* 2011; 133(1):29-40.

Edwards D.H., Li Y., Griffith T.M. Hydrogen peroxide potentiates the EDHF phenomenon by promoting endothelial Ca²⁺ mobilization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28:1774–1781.

Epting C, Coates BM, Engman DM. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 2010; 126: 283–291.

Fang FC, DeGroot MA, Foster JW, Bäuml AJ, Ochsner U, Testerman T, Bearson S, Giárd JC, Xu Y, Campbell G, Laessig T. Virulent *Salmonella typhimurium* has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:7502–7507.

Farkas H, Varga L. Ecallantide is a novel treatment for attacks of hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2011; 4:61–68.

Fernandes MC, Cortez M, Flannery AR, Tam C, Mortara RA, Andrews NW. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. *J Exp Med.* 2011; 208(5):909–921.

Fernandes MC, Cortez M, Geraldo Yoneyama KA, Straus AH, Yoshida N, Mortara RA. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. *Int J Parasitol.* 2007; 37:1431–1441.

Fernandes MC, Flannery AR, Andrews N, Mortara RA. Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. *Cell Microbiol.* 2013; 15(6):977-91.

Ferreira de Almeida Fiuza L, Peres RB, Simões-Silva MR, da Silva PB, Batista DDGJ, da Silva CF, Nefertiti Silva da Gama A, Krishna Reddy TR, Soeiro MNC. Identification of Pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin based CYP51 inhibitors as potential Chagas disease therapeutic alternative: In vitro and in vivo evaluation, binding mode prediction and SAR exploration. *Eur J Med Chem.* 2018; 149:257-268.

Furuya T, Kashuba C, Docampo R, Moreno SNJ. A novel phosphatidylinositol-phospholipase C of *Trypanosoma cruzi* that is lipid modified and activated during tripomastigote to amastigote differentiation. *J Biol Chem.* 2000; 275 (9): 6428-6438.

Gauron C, Meda F, Dupont E, Albadri S, Quenech'Du N, Ipendey E, Volovitch M, Del Bene F, Joliot A1, Rampon C, Vríz S. Hydrogen peroxide (H₂O₂) controls axon pathfinding during zebrafish development. *Dev Biol.* 2016; 414(2):133-41.

GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet.* 2016; 388(10053):1545-1602.

Germain AR, Carmody LC, Dockendorff C, Galan-Rodriguez C, Rodriguez A, Johnston S, Bittker JA, MacPherson L, Dandapani S, Palmer M, Schreiber SL, Munoz B. Identification of small-molecule inhibitors of *Trypanosoma cruzi* replication. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011; 21(23):7197-200.

Giordano R, Chammas R, Veiga SS, Colli W, Alves MJM. An acidic component of the heterogenous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. *Mol Biochem Parasitol*. 1994; 65: 85–94.

Glick D, Barth S, MacLeod K. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010; 221:3–12.

Gnaiger E. Mitochondrial pathways and respiratory control: An introduction to OXPHOS analysis. 4th ed. Mitochondr Physiol Network 19.12. Oroboros MiPNet Publications, Innsbruck. 2014.

Goes GR, Rocha PS, Diniz AR, Aguiar PH, Machado CR, Vieira LQ. *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(4):e0004555.

González J, Cornejo A, Santos MR, Cordero EM, Gutiérrez B, Porcile P, Mortara RA, Sagua H, Da Silveira JF, Araya JE. A novel protein phosphatase 2A (PP2A) is involved in the transformation of human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*. 2003; 374(Pt 3):647-56..

Götz J, Kues W. The role of protein phosphatase 2A catalytic subunit Calpha in embryogenesis: evidence from sequence analysis and localization studies. *Biol Chem*. 1999; 380(9):1117-20.

Grellier P, Blum J, Santana J, Bylèn E, Mouray E, Sinou V, Teixeira AR, Schrével J. Involvement of calyculin A-sensitive phosphatase(s) in the differentiation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 1999; 98(2):239-52.

Groemping Y, Rittinger K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J*. 2005; 386(Pt 3):401-16.

Gron, H. and Hyde-DeRuyscher, R. Peptides as tools in drug discovery. *Curr. Opin. Drug Disc*. 2000; 3, 636–645.

Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393. 2010; 561–564.

Hall BF, Webster P, Ma AK, Joiner KA, Andrews NW. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. *J Exp Med*. 1992; 176(2):313-25.

Hall BS e Wilkinson SR. Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal Formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56: 115-123.

Halliwell B. Free Radicals and other reactive species in disease. *Nature Encyclopedia of life sciences.* 2001; 1–7

Hemminga MA, Vos WL, Nazarov PV, Koehorst RB, Wolfs CJ, Spruijt RB, Stopar D. Viruses: incredible nanomachines. New advances with filamentous phages. *Eur Biophys J.* 2010; 39(4):541-50.

Hernández-Osorio LA, Márquez-Dueñas C, Florencio-Martínez LE, Ballesteros-Rodea G, Martínez-Calvillo S, Manning-Cela RG. Improved Method for In Vitro Secondary Amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: Morphometrical and Molecular Analysis of Intermediate Developmental Forms. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010; 2010:283842.

Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(4):659-88.

Hissa B, Duarte JG, Kelles LF, Santos FP, del Puerto HL, Gazzinelli-Guimarães PH, de Paula AM, Agero U, Mesquita ON, Guatimosim C, Chiari E, Andrade LO. Membrane cholesterol regulates lysosome-plasma membrane fusion events and modulates *Trypanosoma cruzi* invasion of host cells. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(3):e1583.

Hom JR, Quintanilla RA, Hoffman DL, de Mesy Bentley KL, Molkentin JD, Sheu SS, Porter GA Jr. The permeability transition pore controls cardiac mitochondrial maturation and myocyte differentiation. *Dev Cell.* 2011; 21(3):469-78.

Hou Y, Mattson MP, Cheng A. Permeability transition pore-mediated mitochondrial superoxide flashes regulate cortical neural progenitor differentiation. *PLoS One.* 2013; 8(10):e76721.

Hu Y, He K, Wang D, Yuan X, Liu Y, Ji H, Song J. TMEM16A regulates EMT in lung cancer cells by modulating the ROS and IRS-1 signaling pathways. *Carcinogenesis.* 2013; 34(8):1764-72.

Huang JX, Bishop-Hurley SL, Cooper MA. Development of anti-infectives using phage display: biological agents against bacteria, viruses, and parasites. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(9):4569–4582.

Huang W, Li K, Liu A, Yang Z, Hu C, Chen D, Wang H. miR-330-5p inhibits H₂O₂-induced adipogenic differentiation of MSCs by regulating RXR γ . *Int J Mol Med.* 2018; 42(4):2042-2052.

Hui Li, Yi-Feng Luo, Yong-Sheng Wang, Qing Yang, Yong-Long Xiao, Hou-Rong Cai, Can-Mao Xie. Using ROS as a Second Messenger, NADPH Oxidase 2 Mediates Macrophage

Senescence via Interaction with NF- κ B during *Pseudomonas aeruginosa* Infection Oxid Med Cell Longev. 2018; 2018: 9741838.

Irigoín F, Cibils L, Comini MA, Wilkinson SR, Flohé L, Radi R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. Free Radic Biol Med. 2008; 45(6):733-42.

Jabari S, de Oliveira EC, Brehmer A, da Silveira AB. Chagasic megacolon: enteric neurons and related structures. Histochem Cell Biol. 2014; 142(3):235-44.

Jacobs T, Erdmann H, Fleischer B. Molecular interaction of Siglecs (sialic acid-binding Ig-like lectins) with sialylated ligands on *Trypanosoma cruzi*. Eur J Cell Biol. 2010; 89: 113–116.

Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. Biochem J. 2001; 353(Pt 3):417-39.

Keating GM. Romiplostim: a review of its use in immune thrombocytopenia. Drugs. 2012; 72(3):415-35.

Kessler RL, Contreras VT, Marlière NP, Aparecida Guarneri A, Villamizar Silva LH, Mazzarotto GACA, Batista M, Soccol VT, Krieger MA, Probst CM.. Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. Mol Microbiol. 2017; 104(5):712-736.

Khan YA, Andrews NW, Mitra B. ROS regulate differentiation of visceralizing Leishmania species into the virulent amastigote form. Parasitol Open. NIH Public Access; 2018;4.

Kinoshita-Yanaga AT1, Toledo MJ, Araújo SM, Vier BP, Gomes ML. Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: case report. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2009; 51(5):295-8.

Koivunen E, Arap W, Rajotte D, Lahdenranta J, Pasqualini R. Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. J Nucl Med. 1999; 40(5):883-8.

Khusal KG, Tonelli RR, Mattos EC, Soares CO, Di Genova BM, Juliano MA, Urias U, Colli W, Alves MJ. Prokineticin receptor identified by phage display is an entry receptor for *Trypanosoma cruzi* into mammalian cells. Parasitol Res. 2015; 114(1):155-65.

Kuznetsov AV, Javadov S, Saks V, Margreiter R, Grimm M. Synchronism in mitochondrial ROS flashes, membrane depolarization and calcium sparks in human carcinoma cells. Biochim Biophys Acta Bioenerg. 2017; 1858(6):418–431.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014; 15(3):178–196.

Lee SH, Kim JK, Jang HD. Genistein inhibits osteoclastic differentiation of RAW 264.7 cells via regulation of ROS production and scavenging. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(6):10605-21.

Lee SR, Yang KS, Kwon J, Lee C, Jeong W, Rhee SG. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J Biol Chem.* 2002; 277(23):20336-42.

Lepesheva GI, Friggeri L, Waterman MR. CYP51 as drug targets for fungi and protozoan parasites: past, present and future. *Parasitology.* 2018; 145(14):1820-1836.

Ley V, Robbins ES, Nussenzweig V, Andrews NW. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *The Journal of Experimental Medicine.* 1990; 171(2), 401–413.

Li DZ, Zhang QX, Dong XX, Li HD, Ma X. Treatment with hydrogen molecules prevents RANKL-induced osteoclast differentiation associated with inhibition of ROS formation and inactivation of MAPK, AKT and NF-kappa B pathways in murine RAW264.7 cells *J Bone Miner Metab.* 2014; 32(5):494-504.

Lidani KCF, Bavia L, Ambrosio AR, de Messias-Reason IJ. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. *Front Microbiol.* 2017; 8:607.

Lieke T, Gröbe D, Blanchard V, Grunow D, Tauber R, Zimmermann-Kordmann M, Jacobs T, Reutter W. Invasion of *Trypanosoma cruzi* into host cells is impaired by N-propionylmannosamine and other N-acylmannosamines. *Glycoconj J.* 2011; 28(1):31-7.

Lien EC, Dibble CC, Toker A. PI3K signaling in cancer: beyond AKT. *Curr Opin Cell Biol.* 2017; 45:62-71.

Lima FM, Oliveira P, Mortara RA, Silveira JF, Bahia D. The challenge of Chagas' disease: has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? *N Biotechnol* 2010; 27: 837–843.

Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, Serrano MG, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MM. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop.* 2015; 151:166-77.

Lin C, Wang H. NADPH oxidase is involved in H₂O₂-induced differentiation of human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Cell Biol Int.* 2012; 36(4):391-5.

Lindner T, Kolmar H, Haberkorn U, Mier W. DNA libraries for the construction of phage libraries: statistical and structural requirements and synthetic methods. *Molecules.* 2011;16(2):1625–1641.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4):402-8.

Lo Presti MS, Bazán PC, Strauss M, Báez AL, Rivarola HW, Paglini-Oliva PA. Trypanothione reductase inhibitors: Overview of the action of thioridazine in different stages of Chagas disease. *Acta Trop.* 2015; 145:79-87.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-75.

Lyons TW, Reinhard CT, Planavsky NJ. The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. *Nature.* 2014; 506(7488):307-15.

Magder, S. "Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life?" *Critical Care*; 2006; 10: 208.

Manarin R, Pascutti MF, Ruffino JP, De Las Heras B, Boscá L, Bottasso O, Revelli S, Serra E. Benzimidazole blocks NF-kappaB activation but not AP-1 through inhibition of IKK. *Mol Immunol.* 2010; 47(15):2485-91.

Manning-Cela R, Cortes A, Gonzalez-Rey E, Van Voorhis WC, Swindle J, Gonzalez A. LYT1 protein is required for efficient in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 2001; 69: 3916–3923.

Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol.* 2014; 2:535-62.

Martinez A, Peluffo G, Petruk AA, Hugo M, Piñeyro D, Demicheli V, Moreno DM, Lima A, Batthyány C, Durán R, Robello C, Martí MA, Larrieux N, Buschiazzo A, Trujillo M, Radi R, Piacenza L. Structural and molecular basis of the peroxynitrite-mediated nitration and inactivation of *Trypanosoma cruzi* iron-superoxide dismutases (Fe-SODs) A and B: disparate susceptibilities due to the repair of Tyr35 radical by Cys83 in Fe-SODB through intramolecular electron transfer. *J Biol Chem.* 2014; 289(18):12760-78.

Martinez Munoz C, Post JA, Verkleij AJ, Verrips CT, Boonstra J. The effect of hydrogen peroxide on the cyclin D expression in fibroblasts. *Cell Mol Life Sci.* 2001; 58:990–996.

Martins C, Baptista CS, Ienne S, Cerqueira GC, Bartholomeu DC, Zingales B. Genomic organization and transcription analysis of the 195-bp satellite DNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2008;160(1):60-4.

Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. *J Infect Dev Ctries.* 2012; 6 (11): 817-24.

Matsubara T. Potential of peptides as inhibitors and mimotopes: selection of carbohydrate-mimetic peptides from phage display libraries. *J Nucleic Acids.* 2012; 2012:740982.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969; 244(22):6049-55.

McNeil PL, Steinhardt RA. Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003; 19:697-731.

MEDICINAL CHEMISTRY (IUPAC Recommendations 1998). *Pure Appl. Chem.* 1998; 70, 1129.

Medone P, Ceccarelli S, Parham PE, Figuera A, Rabinovich JE. The impact of climate change on the geographical distribution of two vectors of Chagas disease: implications for the force of infection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015; 370(1665).

Menon SG, Sarsour EH, Spitz DR, Higashikubo R, Sturm M, Zhang H, Goswami PC. Redox regulation of the G1 to S phase transition in the mouse embryo fibroblast cell cycle. *Cancer Res.* 2003; 63:2109–2117.

Miller AF. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett.* 2012; 586(5):585-95.

Ming M, Chuenkova M, Ortega-Barria E, Pereira MEA. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 59: 243–252.

Mitchell P. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science.* 1979; 206: 1481–159.

Mittra B, Cortez M, Haydock A, Ramasamy G, Myler JP, Andrews N. Iron uptake controls the generation of *Leishmania* infective forms through regulation of ROS levels *J Exp Med.* 2013; 210(2): 401-416.

Mittra B, Laranjeira-Silva MF, Perrone Bezerra de Menezes J, Jensen J, Michailowsky V, Andrews NW. A Trypanosomatid Iron Transporter that Regulates Mitochondrial Function Is Required for *Leishmania amazonensis* Virulence. *PLoS Pathog. Public Library of Science;* 2016;12: e1005340.

Mittra B, Laranjeira-Silva MF, Miguel DC, Perrone Bezerra De Menezes J, Andrews NW. The iron-dependent mitochondrial superoxide dismutase SODA promotes *Leishmania* virulence. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology;* 2017;292: 12324–12338.

Mittler R. ROS Are Good. *Trends Plant Sci.* 2017; 22(1):11-19.

Molek P, Strukelj B, Bratkovic T. Peptide phage display as a tool for drug discovery: targeting membrane receptors. *Molecules.* 2011; 16(1):857–887.

Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, Pou D, Roure S, Cabezos J, Valerio L, Blanco-Grau A, Sánchez-Montalvá A, Vidal X, Pahissa A. Randomized

trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med*. 2014; 370(20):1899-908.

Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2018; 80:50-64.

Moreira D, Lopez-Garcia P, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004; 54: 1861-1875.

Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velazquez E, Bonilla L, Meeks B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, Connolly SJ, Yusuf S; BENEFIT Investigators. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015; 373(14):1295-306.

Morillo CA, Waskin H, Sosa-Estani S, Del Carmen Bangher M, Cuneo C, Milesi R, Mallagray M, Apt W, Beloscar J, Gascon J, Molina I, Echeverria LE, Colombo H, Perez-Molina JA, Wyss F, Meeks B, Bonilla LR, Gao P, Wei B, McCarthy M, Yusuf S; STOP-CHAGAS Investigators. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic *T. cruzi* Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2017; 69(8):939-947.

Mortara RA, Minelli LM, Vandekerckhove F, Nussenzweig V, Ramalho-Pinto FJ. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) cleavage of GPI-anchored surface molecules of *Trypanosoma cruzi* triggers in vitro morphological reorganization of trypomastigotes. *J Eukaryot Microbiol*. 2001; 48(1):27-37.

Müller J, Hemphill A. Drug target identification in protozoan parasites. *Expert Opin Drug Discov*. 2016; 11(8):815–824.

Muñoz M, Martínez MP, López-Oliva ME, Rodríguez C, Corbacho C, Carballido J, García-Sacristán A, Hernández M, Rivera L, Sáenz-Medina J, Prieto D. Hydrogen peroxide derived from NADPH oxidase 4- and 2 contributes to the endothelium-dependent vasodilatation of intrarenal arteries. *Redox Biol*. 2018; 19:92-104.

Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009; 417(1):1-13.

Nakahata S, Morishita K. PP2A inactivation by ROS accumulation. *Blood*. 2014; 124(14):2163-5.

Ndao M, Beaulieu C, Black WC, Isabel E, Vasquez-Camargo F, Nath-Chowdhury M, Massé F, Mellon C, Methot N, Nicoll-Griffith DA. Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a Chagas disease cure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(2):1167-78.

Nishina Y1, Sumi T, Iwai SA, Nishimune Y. Effects of protein phosphatase inhibition by okadaic acid on the differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 1995; 217(2):288-93.

Nogueira NP, de Souza CF, Saraiva FM, Sultano PE, Dalmau SR, Bruno RE, Gonçalves Rde L, Laranja GA, Leal LH, Coelho MG, Masuda CA, Oliveira MF, Paes MC. Heme-induced ROS in *Trypanosoma cruzi* activates CaMKII-like that triggers epimastigote proliferation. One helpful effect of ROS. *PLoS One.* 2011; 6(10):e25935.

Nogueira NP, Saraiva FM, Sultano PE, Cunha PR, Laranja GA, Justo GA, Sabino KC, Coelho MG, Rossini A, Atella GC, Paes MC. Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: redox status. *PLoS One.* 2015 ; 10(2):e0116712.

Nolan MS, Aguilar D, Brown EL, Gunter SM, Ronca SE, Hanis CL, Murray KO. Continuing evidence of Chagas disease along the Texas-Mexico border. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018; 14;12(11):e0006899.

Nouvellet P, Dumonteil E, Gourbière S. The improbable transmission of *Trypanosoma cruzi* to human: the missing link in the dynamics and control of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(11):e2505.

Nowicki M. O., Falinski R., Koptyra M., Slupianek A., Stoklosa T., Gloc E., Nieborowska-Skorska M., Blasiak J., Skorski T. BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks. *Blood.* 2004; 104, 3746–3753

Noya BA, Dias-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, Suarez JA, Abate T, Naranjo L, Paiva M, Rivas L, Castro J, Márques J, Mendoza I, Acquatella H, Torres J, Noya O. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis.* 2010; 201:1308–1315.

Noya-Rabelo MM, Macedo CT, Larocca T, Machado A, Pacheco T, Torreão J, Souza BSF, Soares MBP, Ribeiro-Dos-Santos R, Correia LCL. The Presence and Extension of Myocardial Fibrosis in the Undetermined Form of Chagas' Disease: A Study Using Magnetic Resonance. *Arq Bras Cardiol.* 2018; 110(2):124-131.

Okamura H, Yang D, Yoshida K, Haneji T. Protein phosphatase 2A α is involved in osteoclastogenesis by regulating RANKL and OPG expression in osteoblasts. *FEBS Lett.* 2013; 587(1):48-53.

Okura M, Fang J, Salto ML, Singer RS, Docampo R, Moreno SN. A lipid-modified phosphoinositide-specific phospholipase C (TcPI-PLC) is involved in differentiation of trypomastigotes to amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 2005; 280(16):16235-43.

Okutsu M, Call JA, Lira VA, Zhang M, Donet JA, French BA, Martin KS, Peirce-Cottler SM, Rembold CM, Annex BH, Yan Z. Extracellular superoxide dismutase ameliorates skeletal muscle abnormalities, cachexia, and exercise intolerance in mice with congestive heart failure. *Circ Heart Fail.* 2014; 7(3):519-30.

PAHO. Chagas in the Americas for the General Public; 2014. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743 (acessado em outubro de 2018).

PAHO. Sistema Nacional de Información en Salud. Boletín de Vigilancia Semanal. La Paz, 2006. Disponível em: www.paho.org/Spanish/DD/PIN/ps060616.htm

PAHO. Disponível em <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-cha-chagas-factsheet-work.pdf>. (acessado em setembro de 2018).

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

Pan X, Chen X, Tong X, Tang C, Li J. Ppp2ca knockout in mice spermatogenesis. Reproduction. 2015; 149(4):385-91.

Pech-Canul AC, Monteón V, Solís-Oviedo RL. A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*. J Parasitol Res. 2017; 2017:3751403.

Pedrique B, Strub-Wourgaft N, Some C, Olliaro P, Trouiller P, Ford N, Pécoul B, Bradol JH. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000-11): a systematic assessment. Lancet Glob Health. 2013; 1(6):e371-9.

Perez CJ, Lymbery AJ, Thompson RCA. Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health. Trends Parasitol. 2015; 31(11):595-603.

Pérez MJ, Quintanilla RA. Development or disease: duality of the mitochondrial permeability transition pore. Dev Biol. 2017; 426(1):1-7.

Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. Lancet. 2018; 391(10115):82-94.

Pessoa CC, Ferreira ER, Bayer-Santos E, Rabinovitch M, Mortara RA, Real F. *Trypanosoma cruzi* Differentiates and Multiplies within Chimeric Parasitophorous Vacuoles in Macrophages Coinfected with *Leishmania amazonensis*. Infect Immun. 2016; 84(5):1603-1614.

Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Indian J Clin Biochem. 2015; 30: 11-26.

Piacenza L, Alvarez MN, Peluffo G, Radi R. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. Curr Opin Microbiol. 2009; 12(4): 415-421.

Piñeyro MD, Arcari T, Robello C, Radi R, Trujillo M. Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite. Arch Biochem Biophys. 2011; 507(2):287-95.

Procópio DO, da Silva S, Cunningham CC, Mortara RA. *Trypanosoma cruzi*: effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization and expression on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. *Exp Parasitol*. 1998; 90(1):1-13.

Pryde KR e Hirst J. Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *J Biol Chem*. 2011; 286(20):18056-65.

Qin W, Li C, Zheng W, Guo Q, Zhang Y, Kang M, Zhang B, Yang B, Li B, Yang H, Wu Y. Inhibition of autophagy promotes metastasis and glycolysis by inducing ROS in gastric cancer cells. *Oncotarget*. 2015; 6(37):39839-54.

Queiroz RM, Charneau S, Mandacaru SC, Schwämmle V, Lima BD, Roepstorff P, Ricart CA. Quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* amastigogenesis. *Mol Cell Proteomics*. 2014; 13(12):3457-72.

Ramos FF, Costa LE, Dias DS, Santos TTO, Rodrigues MR, Lage DP, Salles BCS, Martins VT, Ribeiro PAF, Chávez-Fumagalli MA, Dias ACS, Alves PT, Vieira ÉLM, Roatt BM, Menezes-Souza D, Duarte MC, Teixeira AL, Goulart LR, Coelho EAF. Selection strategy of phage-displayed immunogens based on an in vitro evaluation of the Th1 response of PBMCs and their potential use as a vaccine against *Leishmania infantum* infection. *Parasit Vectors*. 2017; 10(1):617.

Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease) *J Infect Dis Clin North Am*. 2012; 26(2): 2752-91.

Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010; 375(9723): 1388-13402.

Reddy A, Caler EV, Andrews NW. Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*. 2001; 106(2):157-69.

Reddy K.B, Glaros S. Inhibition of the MAP kinase activity suppresses estrogen-induced breast tumor growth both in vitro and in vivo. *Int. J. Oncol.*, 2007; 30:4 971-976.

Reignault LC, Barrias ES, Soares Medeiros LC, de Souza W, de Carvalho TM. Structures containing galectin-3 are recruited to the parasitophorous vacuole containing *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages. *Parasitol Res*. 2014; 113(6):2323-33.

Riley J, Brand S, Voice M, Caballero I, Calvo D, Read KD. Development of a Fluorescence-based *Trypanosoma cruzi* CYP51 Inhibition Assay for Effective Compound Triaging in Drug Discovery Programmes for Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(9):e0004014.

Rocha DA, Silva EB, Fortes IS, Lopes MS, Ferreira RS, Andrade SF. Synthesis and structure-activity relationship studies of cruzain and rhodesain inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2018; 157:1426-1459.

- Rodríguez A, Martínez I, Chung A, Berlot CH, Andrews NW. cAMP regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. *J Biol Chem.* 1999;274(24):16754-9.
- Rubin-de-Celis SS, Uemura H, Yoshida N, Schenkman S. Expression of trypomastigote transsialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cell Microbiol.* 2006; 8: 1888–1898.
- Ruiz FA, Rodrigues CO, Docampo R. Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 2001; 276(28):26114-21.
- Saitoh S., Zhang C., Tune J. Hydrogen peroxide: a feed-forward dilator that couples myocardial metabolism to coronary blood flow. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26:2614–2621.
- Salassa BN, Romano PS. Autophagy: A necessary process during the *Trypanosoma cruzi* life-cycle. *Virulence.* 2018: 1-10.
- Salas-Sarduy E, Landaburu LU, Karpiak J, Madauss KP, Cazzulo JJ, Agüero F, Alvarez VE. Novel scaffolds for inhibition of Cruzipain identified from high-throughput screening of anti-kinetoplastid chemical boxes. *Sci Rep.* 2017; 7(1):12073.
- Saldivia M, Ceballos-Pérez G, Bart JM, Navarro M. The AMPK α 1 Pathway Positively Regulates the Developmental Transition from Proliferation to Quiescence in *Trypanosoma brucei*. *Cell Rep.* 2016; 17(3):660-670.
- Sales Junior PA, Molina I, Fonseca Murta SM, Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Corrêa-Oliveira R, Carneiro CM. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. *Am J Trop Med Hyg.* 2017; 97(5):1289-1303.
- Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Sulleiro E, Moreso F, Berastegui C, Caralt M, Pinazo MJ, Moure Z, Los-Arcos I, Len O, Gavaldà J, Molina I. Prevalence of Chagas Disease among Solid Organ-Transplanted Patients in a Nonendemic Country. *Am J Trop Med Hyg.* 2018; 98(3):742-746.
- Salto ML, Bertello LE, Vieira M, Docampo R, Moreno SN, de Lederkremer RM. Formation and remodeling of inositolphosphoceramide during differentiation of *Trypanosoma cruzi* from trypomastigote to amastigote. *Eukaryot Cell.* 2003; (4):756-68.
- Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 30(8):4117-29.
- Sarsour EH, Kumar MG, Chaudhuri L, Kalen AL, Goswami PC. Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11(12):2985–3011.

Sasaki H, Yamamoto H, Tominaga K, Masuda K, Kawai T, Teshima-Kondo S, Rokutan K. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are essential for differentiation of mouse macrophage cell line (RAW264.7) in osteoclasts. *J Med Invest*. 2009; 56(1-2): 33-41.

Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008; 27(6):608-19.

Sazanov LA, Baradaran R, Efremov RG, Berrisford JM, Minhas G. A long road towards the structure of respiratory complex I, a giant molecular proton pump. *Biochem Soc Trans*. 2013; 41(5):1265-71.

Sbaraglini ML, Bellera CL, Fraccaroli L, Larocca L, Carrillo C, Talevi A, Alba Soto CD. Novel cruzipain inhibitors for the chemotherapy of chronic Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 ;48(1):91-95.

Seidlmayer LK, Gomez-Garcia MR, Blatter LA, Pavlov E, Dedkova EN. Inorganic polyphosphate is a potent activator of the mitochondrial permeability transition pore in cardiac myocytes. *J Gen Physiol*. 2012; 139(5):321–331.

Semenza GL. Life with oxygen. *Science*. 2007; 318(5847):62-4.

Sents W, Meeusen B, Kalev P, Radaelli E, Sagaert X, Miermans E, Haesen D, Lambrecht C, Dewerchin M, Carmeliet P, Westermarck J, Sablina A, Janssens V. PP2A Inactivation Mediated by PPP2R4 Haploinsufficiency Promotes Cancer Development. *Cancer Res*. 2017; 77(24):6825-6837.

Sen S, Kawahara B, Chaudhuri G. Maintenance of higher H₂ O₂ levels, and its mechanism of action to induce growth in breast cancer cells: important roles of bioactive catalase and PP2A. *Free Radic Biol Med*. 2012; 53(8):1541-51.

Seyler RW Jr., Olson JW, Maier RJ. 2001. Superoxide dismutase-deficient mutants of *Helicobacter pylori* are hypersensitive to oxidative stress and defective in host colonization. *Infect Immun* 69:4034–4040.

Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu. Rev. Microbiol*. 1995; 49: 117-143.

Sheth P, Samak G, Shull JA, Seth A, Rao R. Protein phosphatase 2A plays a role in hydrogen peroxide-induced disruption of tight junctions in Caco-2 cell monolayers. *Biochem J*. 2009; 421(1):59–70.

Silveira EA, Ribeiro IS, Amorim MS, Rocha DV, Coutinho HS, Freitas LM, Tomazi L, Silva RA. Correlation between infection rate of triatomines and Chagas Disease in Southwest of Bahia, Brazil: a warning sign? *An Acad Bras Cienc*. 2016; 88(3 Suppl):1941-1951.

Smith GP, Petrenko VA. Phage Display. *Chem Rev*. 1997 ;97(2):391-410.

Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985; 228(4705):1315-7.

Song G, Han M, Li Z, Gan X, Chen X, Yang J, Dong S, Yan M, Wan J, Wang Y, Huang Z, Yin Z, Zheng F. Deletion of Pr72 causes cardiac developmental defects in Zebrafish. *PLoS One*. 2018; 13(11):e0206883.

Stanicka J, Russell EG, Woolley JF, Cotter TG. NADPH oxidase-generated hydrogen peroxide induces DNA damage in mutant FLT3-expressing leukemia cells. *J Biol Chem*. 2015; 290(15):9348-61.

Sykes ML, Avery VM. 3-pyridyl inhibitors with novel activity against *Trypanosoma cruzi* reveal in vitro profiles can aid prediction of putative cytochrome P450 inhibition. *Sci Rep*. 2018; 20;8(1):4901.

Szardenings M. Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential. *J Recept Signal Transduct Res*. 2003; 23(4):307-49.

Takagi Y, Akutsu Y, Doi M, Furukawa K. Utilization of proliferable extracellular amastigotes for transient gene expression, drug sensitivity assay, and CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(1):e0007088.

Tan PL, Shavlakadze T, Grounds MD, Arthur PG. Differential thiol oxidation of the signaling proteins Akt, PTEN or PP2A determines whether Akt phosphorylation is enhanced or inhibited by oxidative stress in C2C12 myotubes derived from skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015; 62:72-9.

Tanaka H, Katagiri M, Arima S, Matsuzaki K, Inokoshi J, Omura S. Neuronal differentiation of Neuro 2a cells by lactacystin and its partial inhibition by the protein phosphatase inhibitors calyculin A and okadaic acid. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 216(1):291-7.

Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA, Heuser JE, Andrews NW. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell*. 1992; 71(7): 1117-1130.

Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH. Atlas didático: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2011.

Teixeira AA, de Vasconcelos Vde C, Colli W, Alves MJ, Giordano RJ. *Trypanosoma cruzi* Binds to Cytokeratin through Conserved Peptide Motifs Found in the Laminin-G-Like Domain of the gp85/Trans-sialidase Proteins. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(9):e0004099.

Teixeira J, Oliveira C, Cagide F, Amorim R, Garrido J, Borges F, Oliveira PJ. Discovery of a new mitochondria permeability transition pore (mPTP) inhibitor based on gallic acid. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017; 33(1):567-576.

Tikunova NV, Morozova VV. Phage display on the base of filamentous bacteriophages: application for recombinant antibodies selection. *Acta Naturae*. 2009;1(3):20–28.

Todorov AG, Einicker-Lamas M, de Castro SL, Oliveira MM, Guilherme A. Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem*. 2000; 275, 32182–32186.

Tomlinson S, Vandekerckhove F, Frevert U, Nussenzweig V. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology*. 1995; 110 (Pt 5):547-54.

Tonelli RR, Silber AM, Almeida-de-Faria M, Hirata IY, Colli W, Alves MJ. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol*. 2004; 8: 733-741.

Tonelli, R.R.; Giordano, R.J.; Barbu, E.M.; Torrecilhas, A.C.; Kobayashi, G.S.; Langley, R.R.; Arap, W.; Pasqualini, R.; Colli, W.; Alves, M.J.M. Role of the gp85/Trans-Sialidases in *Trypanosoma cruzi* Tissue Tropism: Preferential Binding of a Conserved Peptide Motif to the Vasculature In Vivo. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2010, 4(11).

Torrice F, Gascon J, Ortiz L, Alonso-Vega C, Pinazo MJ, Schijman A, Almeida IC, Alves F, Strub-Wourgaft N, Ribeiro I; E1224 Study Group. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18(4):419-430.

Treberg JR, Quinlan CL, Brand MD. Evidence for Two Sites of Superoxide Production by Mitochondrial NADH-Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I). *The Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286(31):27103-27110.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006; 160, 1–40.

Van Nieuwenhove L, Büscher P, Balharbi F, Humbert M, Dieltjens T, Guisez Y, Lejon V. Identification of mimotopes with diagnostic potential for *Trypanosoma brucei* gambiense variant surface glycoproteins using human antibody fractions. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(6):e1682.

Van Nieuwenhove LC, Rogé S, Balharbi F, Dieltjens T, Laurent T, Guisez Y, Büscher P, Lejon V. Identification of peptide mimotopes of *Trypanosoma brucei* gambiense variant surface glycoproteins. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(6):e1189.

Vincent F, Loria P, Pregel M, Stanton R, Kitching L, Nocka K, Doyonnas R, Stepan C, Gilbert A, Schroeter T, Peakman MC. Developing predictive assays: the phenotypic screening "rule of 3". *Sci Transl Med*. 2015; 7(293):293ps15.

Walker DM, Oghumu S, Gupta G, McGwire BS, Drew ME, Satoskar AR. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cell Mol Life Sci*. 2014; 71(7):1245–1263.

Wang X, Li S, Liu Y, Ma C. Redox regulated peroxisome homeostasis. *Redox Biol.* 2015; 4C:104-108.

Wang Y, Zhang SX, Gozal D. Reactive oxygen species and the brain in sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010; 174(3):307-16.

Wermuth, C.G., Ganellin, C.R., Lindberg, P. and Mitscher, L.A. Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry.* 1998; 70, 1129-1143.

West AP, Shadel GS, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(6):389-402.

Wilkinson SR, Bot C, Kelly JM, Hall BS. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. *Curr Top Med Chem.* 2011; 11(16):2072-84.

Wilkowsky SE, Barbieri MA, Stahl P, Isola EL. *Trypanosoma cruzi*: Phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. *Exp. Cell Res.* 2001; 264: 211–218.

Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC, Burleigh BA. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J Cell Sci.* 2003; 116: 3611–3622.

Xiao Q, Luo Z, Pepe AE, Margariti A, Zeng L, Xu Q. Embryonic stem cell differentiation into smooth muscle cells is mediated by Nox4-produced H₂O₂. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009; 296(4):C711-23.

Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN et al. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 2005; 65: 613–621.

Yoshida, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route How the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol. Int.*, 2008, 57(2), 105-109.

Zhang H, Forman HJ. Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Semin Cell Dev Biol.* 2012; 23(7):722-8.

Zhao M, Zhu D, Sun-Waterhouse D, Su G, Lin L, Wang X, Dong Y. In vitro and in vivo studies on adlay-derived seed extracts: phenolic profiles, antioxidant activities, serum uric acid suppression, and xanthine oxidase inhibitory effects. *J Agric Food Chem.* 2014; 62(31):7771-8.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M,

Schijman AG; Second Satellite Meeting. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(7):1051-4.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 2012; 12(2):240-53.

Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. J Exp Med. 2000; 192(7):1001-14.



The Screen of a Phage Display Library Identifies a Peptide That Binds to the Surface of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes and Impairs Their Infection of Mammalian Cells

Jéssica I. de Paula¹, Eduardo J. Lopes-Torres², Marcelo Jacobs-Lorena³, Marcia Cristina Paes^{1,4*} and Sung-Jae Cha^{3*}

OPEN ACCESS

Edited by:
Shuang-yong Xu,
New England Biolabs, United States

Reviewed by:
Weiwei Yang,
New England Biolabs, United States
Marta Helena Branquinha,
Federal University of Rio de Janeiro,
Brazil

***Correspondence:**
Sung-Jae Cha
scha5@jhu.edu
Marcia Cristina Paes
marcia.paes.uerj@gmail.com

Specialty section:
This article was submitted to
Infectious Agents and Disease,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 28 January 2022
Accepted: 15 February 2022
Published: 10 March 2022

Citation:
de Paula JI, Lopes-Torres EJ,
Jacobs-Lorena M, Paes MC and
Cha S-J (2022) The Screen of a
Phage Display Library Identifies
a Peptide That Binds to the Surface
of *Trypanosoma cruzi*
Trypomastigotes and Impairs Their
Infection of Mammalian Cells.
Front. Microbiol. 13:864788.
doi: 10.3389/fmicb.2022.864788

¹ Laboratório de Interação Tripanossomatídeos e Vetores – Departamento de Bioquímica, IBRAG – UERJ, Rio de Janeiro, Brazil, ² Laboratório de Helmintologia Romero Lascasas Porto, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ³ Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Department of Molecular Microbiology and Immunology and Malaria Research Institute, Baltimore, MD, United States, ⁴ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Entomologia Molecular (INCT-EM), Rio de Janeiro, Brazil

Background: Chagas is a neglected tropical disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. On the order of seven million people are infected worldwide and current therapies are limited, highlighting the urgent need for new interventions. *T. cruzi* trypomastigotes can infect a variety of mammalian cells, recognition and adhesion to the host cell being critical for parasite entry. This study focuses on trypomastigote surface ligands involved in cell invasion.

Methods: Three selection rounds of a phage peptide display library for isolation of phages that bind to trypomastigotes, resulted in the identification of the N3 dodecapeptide. N3 peptide binding to *T. cruzi* developmental forms (trypomastigotes, amastigotes and epimastigotes) was evaluated by flow cytometry and immunofluorescence assays. Parasite invasion of Vero cells was assessed by flow cytometry and immunofluorescence assays.

Results: Phage display screening identified the N3 peptide that binds preferentially to the surface of the trypomastigote and amastigote infective forms as opposed to non-infective epimastigotes. Importantly, the N3 peptide, but not a control scrambled peptide, inhibits trypomastigote invasion of Vero cells by 50%.

Conclusion: The N3 peptide specifically binds to *T. cruzi*, and by doing so, inhibits Vero cell infection. Follow-up studies will identify the molecule on the parasite surface to which the N3 peptide binds. This putative *T. cruzi* ligand may advance chemotherapy design and vaccine development.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, phage display, peptide library, infection, trypomastigote

INTRODUCTION

The protozoan parasite *T. cruzi* is the causative agent of Chagas disease, also known as American trypanosomiasis. Currently, about 6 to 7 million people are infected worldwide, most cases occurring in Latin America (World Health Organization [WHO], 2021). Chagas disease is endemic in Latin America but because of migration, the disease has spread beyond endemic regions to become a worldwide health problem (Schmunis and Yadon, 2010; Requena-Méndez et al., 2015; Nguyen and Waseem, 2021).

The *T. cruzi* life cycle involves two hosts, mammals and the insect vector. There are four main developmental stages: the replicative epimastigote and amastigote forms, and the non-replicative infective metacyclic and bloodstream trypomastigote forms (Rassi et al., 2010). Amastigotes can infect vertebrate cells (Fernandes et al., 2013). Trypomastigotes can invade most nucleated cells of the vertebrate host and are crucial to establish intracellular infection (Burlleigh and Andrews, 1995). The infection process is complex and involves a large repertoire of molecules on the parasite surface, including *trans*-sialidases and glycoproteins such as gp82 and gp85 (De Pablos and Osuna, 2012; Cortez et al., 2014; San Francisco et al., 2017; Campetella et al., 2020). Identification of parasite ligand(s) required for cell infection may lead to the development of new drugs and a vaccine against Chagas disease.

Despite the unsuccessful attempts of new treatments, such as posaconazole and the prodrug of ravuconazole, the treatment of Chagas disease is still restricted to two drugs, benznidazole and nifurtimox, both having safety and efficacy profiles that are far from ideal (Pérez-Molina and Molina, 2018). The discovery of new treatment alternatives is urgently needed. Molecules on the surface of the parasite can serve as targets for the development of new drugs or vaccines. In this context, the use of phage peptide display screening is a simple and efficient approach for identifying peptides that target parasite infection, which in turn may lead to the development of new drugs and vaccines (Rahbarnia et al., 2017; Bao et al., 2019).

Here we report on the screening of a phage display library for peptides that bind to the surface of *T. cruzi* trypomastigotes. This led to the identification of the N3 peptide that selectively binds to *T. cruzi* trypomastigotes and by doing so, inhibits host cell infection.

MATERIALS AND METHODS

Trypanosoma cruzi and Mammalian Host Cell Culture

Trypanosoma cruzi epimastigotes (strain Y) were grown in Brain Heart infusion (BHI) with 10% fetal calf serum (FCS) in the presence of hemin (30 μ M) at 28°C for 7 day.

Tissue-derived *T. cruzi* trypomastigotes (strain Y) were obtained from the supernatant of infected Vero cells 6 days after infection. The infected Vero cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 mg/ml), sodium bicarbonate plus 5% FCS at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Extracellular amastigotes were obtained from the 15th day post infection without change of medium from the supernatant of infected Vero cells.

Vero cells (ATCC®CCL-81™) were cultured in DMEM plus 10% FCS at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Phage Selection

A phage library displaying 12-amino acid peptides fused to the N terminal of the pVIII coat protein on the surface of M13 filamentous phage f88.4 (Cha et al., 2015) was used. The composition of the peptides is random, except for fixed cysteines at positions 2 and 11, which form a disulfide bond resulting in an eight-amino acid loop. The phage library has a complexity of 1.5×10^9 different peptides. The recombinant phages were amplified in K91 *Escherichia coli* grown in LB media plus 10 μ g/ml tetracycline. The selection was initiated by incubating 10^{11} phages with 10^9 trypomastigotes for 30 min on ice in DMEM without FBS. The trypomastigotes were then washed six times with PBS to remove unbound and weakly bound phages from the parasites. Bound phages were amplified in the host *E. coli* and precipitated from the culture supernatant by adding an equal volume of 16% polyethylene glycol 8000 (PEG8000, Fisher Scientific). The amplified phages were tittered and used for a new selection as described previously (Cha et al., 2015) performed to enrich for strong binders (Figure 1). At the end of three rounds of selections, 41 random phage colonies were picked for sequencing of the DNA coding for the peptide inserts (Table 1).

Peptide Synthesis and 3D Conformation

Peptide 2.0 Inc., synthesized an N-terminal biotinylated N3 peptide, circularized *via* a disulfide bridge between the two cysteines. A control scrambled peptide, having the same amino acid composition but different sequence, was also synthesized (Figure 2A).

Peptide three-dimensional structures (Figure 2B) were predicted with the ACD/Labs 2018.2.1 (Advanced Chemistry Development, Inc.) ACD/ChemSketch and ACD/3D view softwares.

Binding Assays

Flow Cytometry for N3 Peptide Binding to

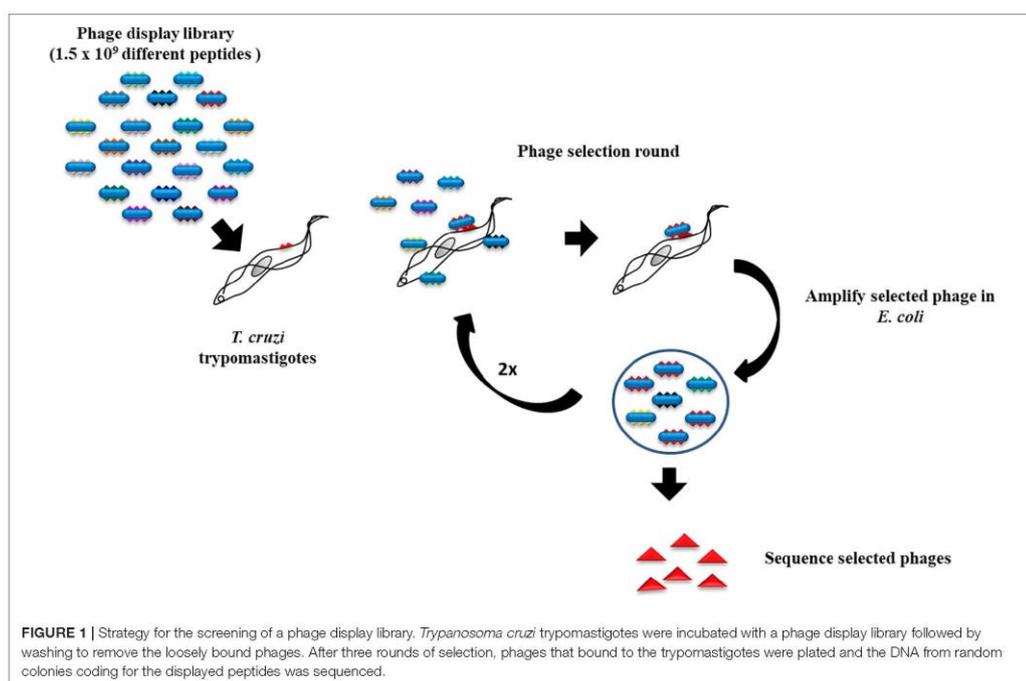
Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi developmental forms, trypomastigotes, amastigotes and epimastigotes, or Vero cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 1 h and blocked with 4% bovine serum albumin for 1 h. Next, parasites or Vero cells were incubated overnight with 0.15 mg/ml of biotinylated peptide (N3 or scrambled). After triple washes with PBS, bound peptides were visualized with Alexa fluor 594-conjugated streptavidin (excitation 591 nm and emission 620 nm). Fluorescence intensity was determined using a Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter).

Fluorescence Assays for N3 Peptide Binding to

Trypanosoma cruzi Trypomastigotes

Peptide binding assays to trypomastigotes followed the same procedures as for the flow cytometry assays. Parasites were



attached to coverslips precoated with 0.01% poly-L-lysine (Sigma-Aldrich), mounted in ProLong[®]Gold antifade with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) reagent (Invitrogen) and analyzed with an Olympus BX51 fluorescence microscope.

Host Cell Invasion

Trypomastigotes were incubated with 0.15 mg/ml peptide (N3 or scrambled) for 15 min on ice, and then fluorescently labeled with succinimidyl ester of carboxyfluorescein (CFSE) according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific; catalog number C34554). After labeling, parasites were used to infect Vero cells (10:1, parasites: Vero) for 3 h and followed by flow cytometry and immunofluorescence assays.

Flow Cytometry

Infected Vero cells in a 6-well plate were trypsinized, washed with PBS and fixed in 1% paraformaldehyde. Vero cell intracellular fluorescence was quantified with Gallios (Beckman Coulter) and analyzed with the Kaluza 1.2 software (Beckman Coulter). The invasion intensity was determined by CFSE fluorescence intensity. The cytometer was adjusted for zero fluorescence with non-infected Vero cells (negative control).

Immunofluorescence Assay

Vero cells were plated and infected in an 8-well chamber slide (Lab-Tek II). After 3 h of interaction, free parasites were

removed, and cells were fixed in 1% paraformaldehyde followed by visualization and quantification of intracellular parasites with a fluorescence microscope. Invasion intensity was determined by measuring the average number of parasites per 100 cells.

Statistical Analysis

Data were analyzed using the GraphPad Prism program. For all results, the One-way ANOVA post Tukey or Dunnet test was applied.

RESULTS

Screening for Peptides With High Affinity to Trypomastigotes' Surface

Trypomastigotes, the infective *T. cruzi* form, can invade a large variety of cell types of its vertebrate host. We screened a phage peptide display library to identify peptides that bind with high affinity to the surface of trypomastigotes (Figure 1). The estimated complexity of the library is 1.5×10^9 different 12-amino acid peptides. To select peptides that have high affinity for trypomastigotes, 10^{11} library phages were incubated with 10^9 trypomastigotes (~100 phages per parasite) and weakly bound phages were removed by washing. Bound phages were amplified by adding host *E. coli* cells and used for the next round of selection. After the third round, 41 random phage colonies from

TABLE 1 | Sequence analysis of 41 random phage clones after the third round of selection.

Phage	Frequency	Nucleotide sequence	Predicted peptide sequence
N1	7/41 (17%)	CAGTGATTGATTTAAAGGTGTATACITGGTGTCCG	QCIDFKVYTWCP
N2	1/41 (2.5%)	GGGTGTGAGGCTTGGTGGTGGGAAGCCTTGAAT	GCEAWWWWKPCN
N3	12/41 (29%)	CAGTGATTGATTTTCCTCAGTTTCTGGTGTCCCT	QCQFPQFLWCP
N4	1/41 (2.5%)	ATTTGTCATAGGGATATGTGGTAGTATTCGTGTATG	ICHRDMW*YSCM
N5	1/41 (2.5%)	GCATGTGGTTCACCTGGTGTAGTATAATGCGCTGTATC	ACGSLVSMRCI
N6	1/41 (2.5%)	GAGTGTGAGTGGTTCATCATCTGAGTTTTGTCCCT	ECBW*HLSFCP
N7	1/41 (2.5%)	CATTGGGGAGGTGGATGATGCTGCTGAGTGTCCG	HCGEVDSHAECF
N8	1/41 (2.5%)	CCTGTACTGGGAGGTAGAATGTGACTCAGTGTCTG	PCTGR*NVYQCL
N9	1/41 (2.5%)	GGGTGTCCGATGCTAAGCAGAAAGCTTACTTTGTCTG	GCPMLSRSLLLCL
N10	1/41 (2.5%)	CTTTGTCATTAGTCTTCTTGTGCTGCGTTGTGTGAG	LCH*SSCAALCE
N11	1/41 (2.5%)	ATGGGTAAAGCCTTCTTATGCGGGTACTGCTTGTACT	MKGPSYAGTACT
N12	1/41 (2.5%)	CAGTGTAAATCAGTGGCCTCAGTTTCATCGGTGTGACG	QCQNPWFHRCQ
N13	1/41 (2.5%)	GATTGTAGAGGGCGGTGTTGTCGTATGATTGTCCCT	DCRGACCSYDCP
N14	1/41 (2.5%)	ATGAGTCAGGCGCTAATCCTAAGCGGTGTTGTATG	MSQAPNPKRCCM
N15	1/41 (2.5%)	AGGTGTACGAAGCGTGTCTTCTGGTTAATTGTGGG	RCTKRVFLVNOG
N16	1/41 (2.5%)	TTGTGTACGCTGCCTCTATTACTAATCTTGTAAAT	LCTLPSINTNCG
N17	2/41 (5.0%)	ATGGGTCCGCATCCTCTGATGTGCCTAAGTGTGCG	MGPHPSDVPKCA
N18	1/41 (2.5%)	CAGTGTCCGAAGCGGAGTCTGCGGTGCTGTTTGG	QCQKRESAVVCL
N19	1/41 (2.5%)	GCTTGTAGTTTGTCTTACTTATAAAGGCTAATGTGTA	ACSLTYK*CV
N20	1/41 (2.5%)	GATTGTAGGAAGGTTGGATTCGTAGTAAGTGTGTG	DCRKMWRSKCV
N21	1/41 (2.5%)	GATTGTAGGAAGGTTGGATTCGTAGTAAGTGTGTG	GCLLEGSWFFCK
N22	1/41 (2.5%)	CATTGTACAGACTCTTTGGCTGTTGATGGTTGTACT	HCGTLLAVDQCT
N23	1/41 (2.5%)	ATGAGTCAGGCGCTAATCCTAAGCGGTGTTGTATG	QCCKAWRITPCL

Times/chamber for statistical analysis.

*Indicates a stop codon.

two independent experiments were picked for sequencing of the DNA encoding the displayed peptide. About 30% of the phages (12/41)–termed N3–displayed the same peptide, and 17% (7/41)–termed N1–displayed the second most frequent peptide. The remaining phages displayed peptides represented only once or twice (Table 1). Considering the high complexity of the initial phage library, the high proportion of phages displaying the same peptide suggests that they specifically bind to trypomastigotes. For further experiments, we had two peptides synthesized: the N3 peptide and a scrambled peptide with the same amino acid composition but different sequence, to be used as a specificity control (Figure 2).

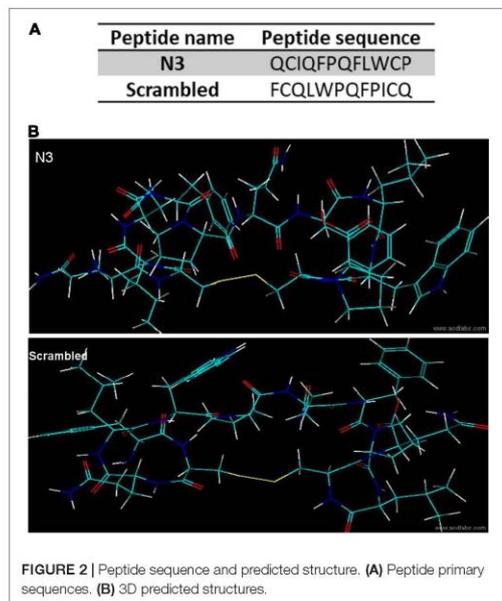
The N3 Peptide Binds Specifically to Infective Parasite Forms

To test the specificity of the N3 peptide interaction with *T. cruzi*, we incubated biotinylated N3 and scrambled peptides with trypomastigotes, amastigotes, epimastigotes and with host Vero cells, and assayed for peptide binding using flow cytometry (Figure 3). The median fluorescence of the N3 peptide binding to trypomastigotes and amastigotes forms that can infect mammalian host cells is 1.7 and 2.5-fold higher than the control, respectively. N3 peptide binding to epimastigotes is 1.2-fold higher than control, and no significant binding to the Vero cells was detected. The control scrambled peptide bound neither to parasites nor to host cells. These results were confirmed by fluorescence microscopy. As shown in Figure 4,

the N3 peptide, but not its scrambled counterpart, binds to trypomastigotes.

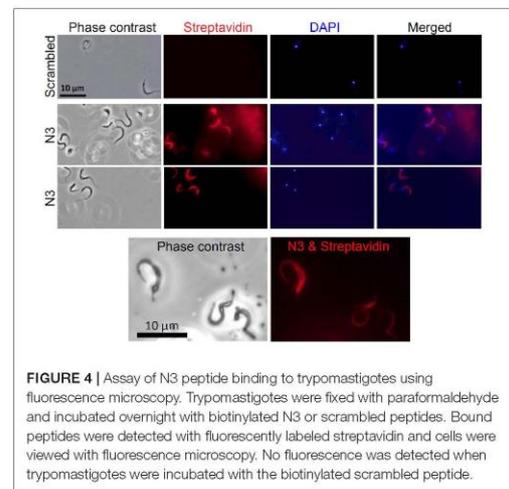
The N3 Peptide Inhibits Trypomastigote Infection of Vero Cells

The specific binding of the N3 peptide to the infective *T. cruzi* forms raises two possible interpretations: (1) N3 binds to a *T. cruzi* surface molecule involved in host cell infection or (2) N3 binds to a molecule unrelated to infection. To distinguish between the two possibilities, trypomastigotes were fluorescently labeled by incubation with CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) and incubated with peptide (N3 or scrambled) before Vero cell interaction assays. Free parasites were then removed by washing and infection intensity was analyzed by fluorescence microscopy and flow cytometry. Microscopic counting found that N3 peptide treatment reduced infection rate (% Vero cells infected) by 20% compared to no peptide control (Figure 5A), and infection intensity (number of parasites per host cell) was reduced by 60% (Figure 5B). The scrambled peptide had no significant effect. These results were confirmed when evaluated by flow cytometry. Figures 5C,D shows that N3 peptide treatment decreases fluorescence, indicating a reduction of parasite infection. This was confirmed by comparison of median fluorescence intensities: N3 peptide treatment reduced fluorescence intensity by 55% compared to the no-peptide control.

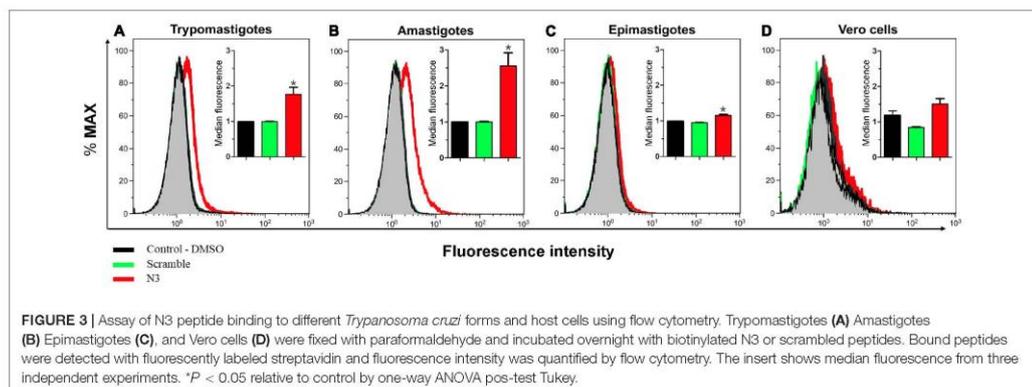


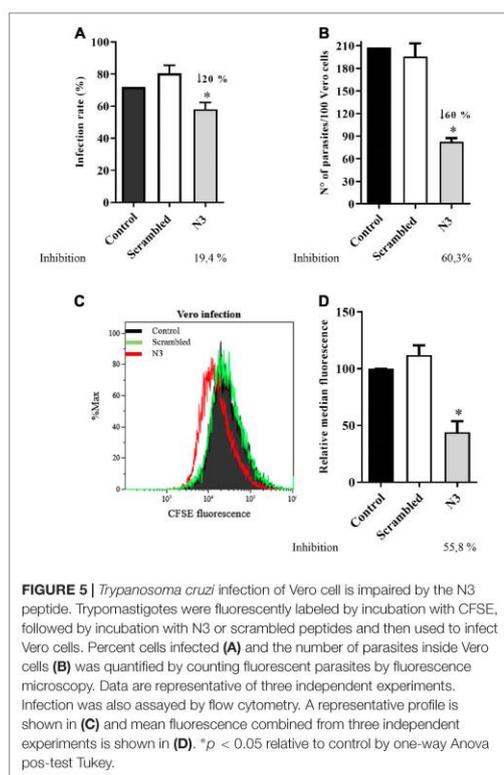
DISCUSSION

Peptides identified with the phage display approach have been used clinically to treat diseases. For instance, Ecallantide is a serine protease inhibitor that has been used to treat hereditary angioedema (Markland et al., 1996; Ladner et al., 2007; Farkas and Varga, 2011; MacGinnitie et al., 2012). Another example is Romiplostim (Nplate®), a thrombopoietin receptor agonist used to treat thrombocytopenia (Cwirla et al., 1997; Keating, 2012; Tarantino et al., 2019). The phage display approach led to the identification of a peptide that structurally mimics



glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) on the surface of *Plasmodium* sporozoites; this peptide became a new vaccine candidate for targeting malaria liver invasion (Cha et al., 2016, 2018). The phage display approach was used to search for mimotopes of the *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein (VSG). These mimotopes are important for diagnosing the disease using an antibody detection test (van Nieuwenhove et al., 2011, 2012). In *Leishmania*, the technique was used for vaccine development. The serum of patients with cutaneous (*L. amazonensis* infection) or visceral (*L. infantum* infection) leishmaniasis was used for biopanning. The selected peptides were immunogenic, inducing specific T helper 1 (Th-1) response (Ramos et al., 2017; Carvalho et al., 2019). Phage display is also being used to diagnose canine leishmaniasis and as a marker for human visceral leishmaniasis (Costa et al., 2019; Machado et al., 2019).





In *T. cruzi*, the phage display contributed to elucidate the interaction of glycoproteins from the *trans*-sialidase/gp85 family with mammalian host cells. In this context, the use of phages expressing FLY (a *trans*-sialidase/gp85 motif peptide) demonstrated the participation of the enzyme in the interaction with endothelial cells. In addition, an important new motif of *trans*-sialidase/gp85 (TS9) and the receptor on the host cell that binds to gp85, the prokineticin-2 receptor (PKR2), has been identified (Tonelli et al., 2010; Khusal et al., 2015; Teixeira et al., 2015). Recently, phage display has been used to study immune response in order to find new epitopes and antigens or to understanding pathological manifestation in Chagas Disease (Niborski et al., 2021; Teixeira et al., 2021). Furthermore, phage display screening led to the identification of a peptide (named EPI18) that binds to the surface of the non-infective epimastigote form (Sáenz-García et al., 2020).

The trypomastigote is the classical infectious form of *T. cruzi*, although invasion of vertebrate host cells by amastigotes has also been described. *T. cruzi* uses several mechanisms and surface molecules to enter the host cell (Caradonna and Burleigh, 2011; Nagajyothi et al., 2011; Leiria Campo et al., 2016). Entry of the host cell is essential to complete the parasite's life cycle

and infection spread, thus this is a promising target for the development of new therapeutic strategies (Walker et al., 2013). In this work, we used the same phage library that was used to identify a GAPDH ligand molecule on the surface of the invasive *Plasmodium* sporozoite (Cha et al., 2016, 2018). Here we showed that the N3 peptide binds to the *T. cruzi* invasive forms (Lima et al., 2010; Salassa and Romano, 2018) and importantly, by doing so, inhibits target cell infection. Our results also suggest that N3 is relevant for other stages of infection besides the interaction itself, as the load significantly decreases within the infected cell. As N3 did not bind to the non-infective forms, the possibility arises that the infective trypomastigotes and amastigotes display on their surface a common ligand that is recognized by N3. Investigation of this possibility is under way.

CONCLUSION

A phage display screen led to the identification of the N3 peptide that binds to the surface of trypomastigotes and inhibits host mammalian cell infection. Future identification of the target molecule may lead to the development of a new vaccine antigen and therapeutic target.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JP, MP, S-JC, and MJ-L contributed to the conception and design of the study. JP and S-JC performed the experiments. JP, MP, EL-T, and S-JC contributed to analyses of data. JP wrote first version of manuscript. MP, S-JC, and MJ-L provided input for manuscript revisions. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was financed in part by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) through the grant from Cientista do Nosso Estado (CNE) E-26/203.213/2015 (awarded to MP) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001 (awarded to JP). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Norma W. Andrews for providing *T. cruzi* trypomastigotes for Vero cell cultures, and Gustavo Travassos Laranja for helping with cytometry and fluorescence microscopy.

REFERENCES

- Bao, Q., Li, X., Han, G., Zhu, Y., Mao, C., and Yang, M. (2019). Phage-based vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 145, 40–56. doi: 10.1016/j.addr.2018.12.013
- Burleigh, B. A., and Andrews, N. W. (1995). The mechanisms of trypanosoma cruzi invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 175–200. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.001135
- Campetella, O., Buscaglia, C. A., Mucci, J., and Leguizamón, M. S. (2020). Parasite-host glycan interactions during *Trypanosoma cruzi* infection: trans-Sialidase rides the show. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1866:165692. doi: 10.1016/j.bbdis.2020.165692
- Caradonna, K. L., and Burleigh, B. A. (2011). “Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*.” *Adv. Parasitol.* 76, 33–61. doi: 10.1016/B978-0-12-385895-5.00002-5
- Carvalho, G. B., Costa, L. E., Lage, D. P., Ramos, F. F., Santos, T. T. O., Ribeiro, P. A. F., et al. (2019). High-through identification of T cell-specific phage-exposed mimotopes using PBMCs from tegumentary leishmaniasis patients and their use as vaccine candidates against *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology* 146, 322–332. doi: 10.1017/S003182182018001403
- Cha, S. J., Kim, M. S., Pandey, A., and Jacobs-Lorena, M. (2016). Identification of GAP DH on the surface of *Plasmodium sporozoites* as a new candidate for targeting malaria liver invasion. *J. Exp. Med.* 213, 2099–2112. doi: 10.1084/jem.20160059
- Cha, S. J., McLean, K. J., and Jacobs-Lorena, M. (2018). Identification of plasmodium GAPDH epitopes for generation of antibodies that inhibit malaria infection. *Life Sci. Alliance* 1:e201800111. doi: 10.26508/lsa.201800111
- Cha, S. J., Park, K., Srinivasan, P., Schindler, C. W., Van Rooijen, N., Stins, M., et al. (2015). CD68 acts as a major gateway for malaria sporozoite liver infection. *J. Exp. Med.* 212, 1391–1403. doi: 10.1084/jem.20110575
- Cortez, C., Sobreira, T. J. P., Maeda, F. Y., and Yoshida, N. (2014). The gp82 surface molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. *Sub-Cell. Biochem.* 74, 137–150. doi: 10.1007/978-94-007-7305-9_6
- Costa, L. E., Alves, P. T., Carneiro, A. P., Dias, A. C. S., Fujimura, P. T., Araujo, G. R., et al. (2019). *Leishmania infantum* β -tubulin identified by reverse engineering technology through phage display applied as a theranostic marker for human visceral leishmaniasis. *Int. J. Mol. Sci.* 20:1812. doi: 10.3390/ijms20081812
- Cwirla, S. E., Balasubramanian, P., Duffin, D. J., Wagstrom, C. R., Gates, C. M., Singer, S. C., et al. (1997). Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine. *Science* 276, 1696–1699. doi: 10.1126/science.276.5319.1696
- De Pablos, L. M., and Osuna, A. (2012). Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. *Infect. Immun.* 80, 2258–2264. doi: 10.1128/IAI.06225-6211
- Farkas, H., and Varga, L. (2011). Ecallantide is a novel treatment for attacks of hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency. *Clin. Cosmetic Investigational Dermatol.* 4:61. doi: 10.2147/ccid.s10322
- Fernandes, M. C., Flannery, A. R., Andrews, N., and Mortara, R. A. (2013). Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. *Cell Microbiol.* 15, 977–991. doi: 10.1111/cmi.12090
- Keating, G. M. (2012). Romiplostim: a review of its use in immune thrombocytopenia. *Drugs* 72, 415–435. doi: 10.2165/11208260-000000000-00000
- Khusal, K. G., Tonelli, R. R., Mattos, E. C., Soares, C. O., Di Genova, B. M., Juliano, M. A., et al. (2015). Prokineticin receptor identified by phage display is an entry receptor for *Trypanosoma cruzi* into mammalian cells. *Parasitol. Res.* 114, 155–165. doi: 10.1007/s00436-014-4172-4176
- Ladner, R., Kent, R., Ley, A., Nixon, A., and Sexton, D. (2007). Discovery of ecallantide: a potent and selective inhibitor of plasma kallikrein. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119:S312. doi: 10.1016/j.jaci.2006.12.591
- Leiria Campo, V., Braga Martins-Teixeira, M., and Carvalho, I. (2016). *Trypanosoma cruzi* invasion into host cells: a complex molecular targets interplay. *Mini-Rev. Med. Chem.* 16, 1084–1097. doi: 10.2174/1389557516666160607230238
- Lima, F. M., Oliveira, P., Mortara, R. A., Silveira, J. F., and Bahia, D. (2010). The challenge of Chagas' disease: has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? *New Biotechnol.* 27, 837–843. doi: 10.1016/j.nbt.2010.02.003
- MacGinnitie, A. J., Campion, M., Stolz, L. E., and Pullman, W. E. (2012). Ecallantide for treatment of acute hereditary angioedema attacks: analysis of efficacy by patient characteristics. *Allergy Asthma Proc.* 33, 178–185. doi: 10.2500/aap.2012.33.3528
- Machado, J. M., Costa, L. E., Dias, D. S., Ribeiro, P. A. F., Martins, V. T., Lage, D. P., et al. (2019). Diagnostic markers selected by immunoproteomics and phage display applied for the serodiagnosis of canine leishmaniosis. *Res. Vet. Sci.* 126, 4–8. doi: 10.1016/j.rvsc.2019.08.010
- Markland, W., Ley, A. C., and Ladner, R. C. (1996). Iterative optimization of high-affinity protease inhibitors using phage display. 2. Plasma kallikrein and thrombin. *Biochemistry* 35, 8058–8067. doi: 10.1021/bi952629y
- Nagajothi, F., Weiss, L. M., Silver, D. L., Desruisseaux, M. S., Scherer, P. E., Herz, J., et al. (2011). *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 5:e953. doi: 10.1371/journal.pntd.0000953
- Nguyen, T., and Waseem, M. (2021). Chagas disease. *Med. Interna de Mexico* 34, 959–970. doi: 10.24245/mim.v34i6.2217
- Niborski, I. L., Potenza, M., Chirivi, R. G. S., Simonetti, L., Ossowski, M. S., Grippo, V., et al. (2021). Recombinant antibody against *Trypanosoma cruzi* from patients with chronic chagas heart disease recognizes mammalian nervous system. *EBioMedicine* 63:103206. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.103206
- Pérez-Molina, J. A., and Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet* 391, 82–94. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31612-3
- Rahbarnia, L., Farajnia, S., Babaei, H., Majidi, J., Veisi, K., Ahmadzadeh, V., et al. (2017). Evolution of phage display technology: from discovery to application. *J. Drug Target.* 25, 216–224. doi: 10.1080/1061186X.2016.1258570
- Ramos, F. F., Costa, L. E., Dias, D. S., Santos, T. T. O., Rodrigues, M. R., Lage, D. P., et al. (2017). Selection strategy of phage-displayed immunogens based on an in vitro evaluation of the Th1 response of PBMCs and their potential use as a vaccine against *Leishmania infantum* infection. *Parasites Vectors* 10:617. doi: 10.1186/s13071-017-2576-2578
- Rassi, A., Rassi, A., and Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet* 375, 1388–1402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X
- Requena-Méndez, A., Aldasoro, E., de Lazzari, E., Sicuri, E., Brown, M., Moore, D. A. J., et al. (2015). Prevalence of chagas disease in latin-american migrants living in europe: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 9:e0003540. doi: 10.1371/journal.pntd.0003540
- Sáenz-García, J. L., Yamanaka, I. B., Pacheco-Lugo, L. A., Miranda, J. S., Córneo, E. S., Machado-de-Ávila, R. A., et al. (2020). Targeting epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* with a peptide isolated from a phage display random library. *Exp. Parasitol.* 210:107830. doi: 10.1016/j.exppara.2020.107830
- Salassa, B. N., and Romano, P. S. (2018). Autophagy: a necessary process during the *Trypanosoma cruzi* life-cycle. *Virulence* 10, 1–10. doi: 10.1080/21505594.2018.1543517
- San Francisco, J., Barria, I., Gutiérrez, B., Neira, I., Muñoz, C., Sagua, H., et al. (2017). Decreased cruzipain and gp85/trans-sialidase family protein expression contributes to loss of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote virulence. *Microbes Infect.* 19, 55–61. doi: 10.1016/j.micinf.2016.08.003
- Schmunis, G. A., and Yadon, Z. E. (2010). Chagas disease: a latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 115, 14–21. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.11.003
- Tarantino, M. D., Busse, J. B., Blanchette, V. S., Beam, D., Roy, J., Despotovic, I., et al. (2019). Long-term treatment with romiplostim and treatment-free platelet responses in children with chronic immune thrombocytopenia. *Haematologica* 104, 2283–2291. doi: 10.3324/haematol.2018.202283
- Teixeira, A. A. R., Carnero, L. R., Kuramoto, A., Tang, F. H. F., Gomes, C. H., Pereira, N. B., et al. (2021). A refined genome phage display methodology delineates the human antibody response in patients with chagas disease. *iScience* 24:102540. doi: 10.1016/j.isci.2021.102540
- Teixeira, A. A. R., de Vasconcelos, V., de, C. S., Colli, W., Alves, M. J. M., and Giordano, R. J. (2015). *Trypanosoma cruzi* binds to cytookeratin through conserved peptide motifs found in the Laminin-G-Like domain of the

- gp85/Trans-sialidase proteins. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 9:e0004099. doi: 10.1371/journal.pntd.0004099
- Tonelli, R. R., Giordano, R. J., Barbu, E. M., Torrecilhas, A. C., Kobayashi, G. S., Langley, R. R., et al. (2010). Role of the gp85/trans-sialidases in *Trypanosoma Cruzi* tissue tropism: preferential binding of a conserved peptide motif to the vasculature in vivo. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 4:e864. doi: 10.1371/journal.pntd.0000864
- van Nieuwenhove, L. C., Rogé, S., Balharbi, F., Dieltjens, T., Laurent, T., Guisez, Y., et al. (2011). Identification of peptide mimotopes of *Trypanosoma brucei* gambiense variant surface glycoproteins. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 5:e1189. doi: 10.1371/journal.pntd.0001189
- van Nieuwenhove, L., Büscher, P., Balharbi, F., Humbert, M., Dieltjens, T., Guisez, Y., et al. (2012). Identification of mimotopes with diagnostic potential for *trypanosoma brucei* gambiense variant surface glycoproteins using human antibody fractions. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 6:e1682. doi: 10.1371/journal.pntd.0001682
- Walker, D. M., Oghumu, S., Gupta, G., McGwire, B. S., Drew, M. E., and Satoskar, A. R. (2013). Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 1245–1263. doi: 10.1007/s00018-013-1491-1491
- World Health Organization [WHO] (2021). *Chagas Disease (also known as American trypanosomiasis)*. Geneva: WHO.
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.
- Copyright © 2022 de Paula, Lopes-Torres, Jacobs-Lorena, Paes and Cha. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

APÊNDICE B – Artigo publicado

BBA - Molecular Basis of Disease 1866 (2020) 165951



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Molecular Basis of Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbadis



New perspectives for hydrogen peroxide in the amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*



Jéssica Isis Oliveira Paula^a, Jonathan da Silva Pinto^a, Ana Rossini^b, Natália Pereira Nogueira^{a,c},
Marcia Cristina Paes^{a,b,c,*}

^aLaboratório de Interação de Tripanossomatídeos e Vetores - Departamento de Bioquímica, IBRAG - UERJ, Rio de Janeiro, Brazil

^bLaboratório de Toxicologia e Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, IBRAG - UERJ, Rio de Janeiro, Brazil

^cInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Entomologia Molecular (INCT-EM), Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Trypanosoma cruzi
Amastigogenesis
Hydrogen peroxide
FeSODA
Mitochondrial permeability transition pore

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi has a complex life cycle involving four life stages: the replicative epimastigotes and metacyclic trypomastigotes in the invertebrate host digestive tract, and intracellular amastigotes and bloodstream trypomastigotes in the mammalian host. Trypomastigotes can invade any nucleated cell, including macrophages, which produce ROS that enhance intracellular infection. However, how ROS modulate *T. cruzi* infection in the mammalian cell remains unclear. Therefore, the present work aimed to investigate the role of ROS during the stimulation of amastigogenesis *in vitro*. Our results showed that H₂O₂ improves the differentiation process *in vitro* and that it was impaired by Peg-Catalase. However, the antioxidants GSH and NAC had no influence on induced amastigogenesis, which suggests the specificity of H₂O₂ to increase intracellular differentiation. Amastigogenesis physiologically occurs in low pH, thus we investigated whether parasites are able to produce ROS during amastigogenesis. Interestingly, after 60 min of differentiation induction *in vitro*, we observed an increase in H₂O₂ production, which was inhibited by the mitochondrial-targeted antioxidant, mitoTEMPO and Cyclosporine A (a mitochondrial permeability transition pore -mPTP- inhibitor), suggesting mitochondrion as a H₂O₂ source. Indeed, quantitative real time (qPCR) showed an increase of the mitochondrial superoxide dismutase (FeSODA) gene expression after 60 min of induced amastigogenesis, reinforcing the hypothesis of mitochondrial ROS induction during intracellular differentiation of *T. cruzi*. The reduction of cellular respiration and the decreased ΔΨ_m observed during amastigogenesis can explain the increased mitochondrial ROS through mPTP opening. In conclusion, our results suggest that H₂O₂ is involved in the amastigogenesis of *T. cruzi*.

1. Introduction

Trypanosoma cruzi causes Chagas disease, which affects millions of people especially in Latin America [1]. *T. cruzi* can be transmitted to humans by a blood-feeding vector of the Triatominae subfamily, by blood transfusion, organ transplantation, congenitally, orally or through laboratory accidents [2,3].

T. cruzi has a complex life cycle that includes invertebrate and vertebrate hosts. The invertebrate hosts are known as kissing bugs while humans are one of the many vertebrate hosts that *T. cruzi* can infect. During a blood meal, the insect vector can ingest trypomastigotes present in the bloodstream of the vertebrates. In the intestinal tract of the insect vector, trypomastigotes differentiate to epimastigotes that multiply. Afterwards still in the intestinal tract, the epimastigotes differentiate to metacyclic trypomastigotes which are the infective

forms. These metacyclic forms are eliminated in the feces and then penetrate into the vertebrates through the insect bite site. Once inside the bloodstream, they can infect all nucleated cell types [4]. After invasion, trypomastigotes differentiate to amastigotes that can multiply inside the host cells. Amastigotes convert back into trypomastigotes, which are released from the lysed host cell and invade new cells or are available in the blood for transmission [4,5].

In view of its life cycle, *T. cruzi* survives under different environmental conditions that induce the morphological changes of the different stages of the parasite. The four life stages and environmental conditions of *T. cruzi* are: epimastigotes and metacyclic trypomastigotes inhabit the insect vector digestive tract at 27 °C, while the amastigotes and bloodstream trypomastigotes reside inside the vertebrate host at 37 °C [4,6]. All these life forms alternate among themselves by differentiation processes and are crucial for parasite survival [4].

* Corresponding author at: Boulevard 28 de Setembro, 87 fundos, PAPC, IBRAG 4º andar Bioquímica, Rio de Janeiro, Brazil.
E-mail address: mcpaes@uerj.br (M.C. Paes).

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165951>

Received 17 April 2020; Received in revised form 18 August 2020; Accepted 20 August 2020

Available online 27 August 2020

0925-4439/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Metacyclogenesis is triggered by a shift in the redox status in the digestive tract of the insect vector, from an oxidative environment provided by the blood digestion (where epimastigotes proliferate intensely) into a reductive environment promoted by the urate-rich urine of the triatomines (where epimastigotes stop proliferation and differentiate into metacyclic trypomastigotes) [7].

Amastigogenesis, on the other hand, is the first differentiation that occurs inside the vertebrate host after invasion, from non-replicating trypomastigotes into intracellular replicating. This process can be mimicked *in vitro* by incubating trypomastigotes in a low pH media [8,9]. The stimulus for trypomastigotes to turn into amastigotes occurs inside the acidic environment of the phagolysosome where in the case of macrophages, the cells can produce reactive oxygen species (ROS) [8,10]. Curiously, ROS has been described as a fuel for the intracellular infection of *T. cruzi*, wherein its absence through antioxidant treatments or NADPH oxidase knock-out has been shown to impair host cell infection [11,12]. Furthermore, Fe-dependent superoxide dismutase (Fe-SOD) from *T. cruzi* showed pivotal role during phagocytosis and contribute to vertebrate host infection [13,14]. This enzyme has two main isoforms, the cytosolic Fe-SODB and Fe-SODA, localized in the mitochondrion, both catalyze the dismutation of high reactive superoxide radicals ($O_2^{\cdot -}$) to other ROS, hydrogen peroxide (H_2O_2) [15].

In this work, we investigated the role of hydrogen peroxide, an important reactive oxygen species, in *in vitro* amastigogenesis induced by low pH and the mitochondrial involvement in this process.

2. Experimental procedures

2.1. *T. cruzi* and mammalian cultures

Vero cells (ATCC® CCL-81™) were cultured in complete DMEM (hgDMEM) (Gibco – Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with penicillin ($100 \text{ units mL}^{-1}$) and streptomycin (100 mg mL^{-1}) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), sodium bicarbonate (3.7 g/L), plus 10% FBS at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere.

Tissue-derived trypomastigotes of *T. cruzi* (strain Y – COLPROT 106) were obtained from the supernatant of infected Vero cells cultured with complete DMEM plus 10% FBS at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere.

2.2. *In vitro* amastigogenesis assays

The differentiation process of trypomastigotes into amastigotes was induced by low pH according to the method described by Hernández-Osório et al. [16] with a few modifications. Briefly, tissue culture-derived trypomastigotes were incubated at $5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ in hgDMEM at pH 5.0 (low pH) and 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere. After 24 h, almost 100% of the parasites showed amastigote morphology (rounded morphology). The amastigogenesis process was induced for 2 h in order to assay the effect of the oxidant hydrogen peroxide (H_2O_2) and three antioxidants in the differentiation process. We used H_2O_2 ($30 \mu\text{M}$) and the antioxidants were NAC at 1 mM, a reduced form of Glutathione (GSH) also at 1 mM and Catalase-polyethylene glycol (Peg-Catalase) at 100 U/mL . After 2 h or 24 h, parasites were washed and fixed with 4% paraformaldehyde and the efficiency of the *in vitro* amastigogenesis was evaluated by calculating the percentage of rounded forms and Ssp-4 expression.

The parasites were stained with Papanicolaou reagent, based on the Romanowsky method, and then, the number of rounded parasites was determined per 100 cells chosen randomly by light microscopy. All experiments were carried out in duplicate for three independent experiments.

2.3. Ssp-4 glycoprotein expression by flow cytometry

Flow cytometry experiments were performed on non-induced trypomastigotes (0 h) and induced trypomastigotes parasites as described above using a Gallios apparatus with a 488-nm ion-argon laser (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). A total of 50,000 events were acquired and the data collected were analyzed using Kaluza software (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). In order to analyze the amastigote specific surface glycoprotein Ssp4, the parasites were fixed with 4% paraformaldehyde and incubated at 28°C with the 2C2 anti-Ssp4 monoclonal antibody diluted to 1:3200 in PBS. The anti-Ssp4 antibody was kindly provided by Dr. Renato Mortara from Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). After 1 h of incubation, the samples were washed with PBS and incubated for another 1 h under the same conditions with a goat anti-mouse secondary antibody coupled to Alexa Fluor 488 diluted to 1:1000 in PBS. After which the parasites were collected by centrifugation, $3000 \times g$ for 10 min, suspended in 1 mL of PBS and then immediately analyzed by flow cytometry. All experiments were carried out in duplicate and for two independent experiments.

2.4. Reactive species and H_2O_2 production

Amastigogenesis was induced by low pH (hgDMEM pH 5) as described above for 30, 60, 90 or 180 min. After each time, parasites were loaded in hgDMEM without phenol red but with $CM-H_2DCFDA$ $2 \mu\text{M}$ for 30 min. After this time, the intracellular ROS production was measured using a Gallios apparatus with a 488-nm ion-argon laser and data was analyzed using Kaluza software. All three independent experiments were carried out in duplicate.

In order to measure the amount of H_2O_2 released, amastigogenesis was induced by low pH (hgDMEM pH 5.0) as described above for 30, 60, 90 or 180 min as well as for 60 min in the presence and absence of mitoTEMPO (100 nM) or Cyclosporine A (500 nM). Then, the parasites were washed with PBS and incubated in a working solution containing $5 \mu\text{M}$ of Amplex UltraRed reagent and 1 U/mL of horseradish peroxidase for 30 min. After which, the parasites were separated by centrifugation at $3000g$ for 10 min and then the supernatants were analyzed in an EnVision® 2105 multimode plate reader using an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. Data were calibrated by adding increasing concentrations of freshly prepared H_2O_2 solutions. All three independent experiments were performed in duplicate.

2.5. High resolution respirometry

After amastigogenesis induction by hgDMEM pH 5.0 for 60 or 120 min, O_2 consumption rates of intact parasites (5×10^7 parasites/chamber) were evaluated by high-resolution respirometry (Oxygraph-2K; OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria) under continuous stirring. The temperature was maintained at 37°C . Oxygen concentrations and flux were recorded using DatLab software 5.1.1.9 (Oxygraph-2K-OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria). The noncoupled state of maximum respiration was induced by the addition of up to 100 nM of carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), thus allowing the maximal capacity of the electron transfer system to be measured. Respiration was inhibited by the addition of $2 \mu\text{g/mL}$ Antimycin A (AA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to determine residual oxygen consumption (ROX). Protein concentration was determined by the Lowry method, using bovine serum albumin as the standard [17]. Physiological respiratory activity (Routine) and maximal capacity of the electron transfer system (ETS) data were calculated by subtracting the ROX consumption values from the initial oxygen consumption and after the addition of FCCP, respectively [18]. All three independent experiments were performed in duplicate.

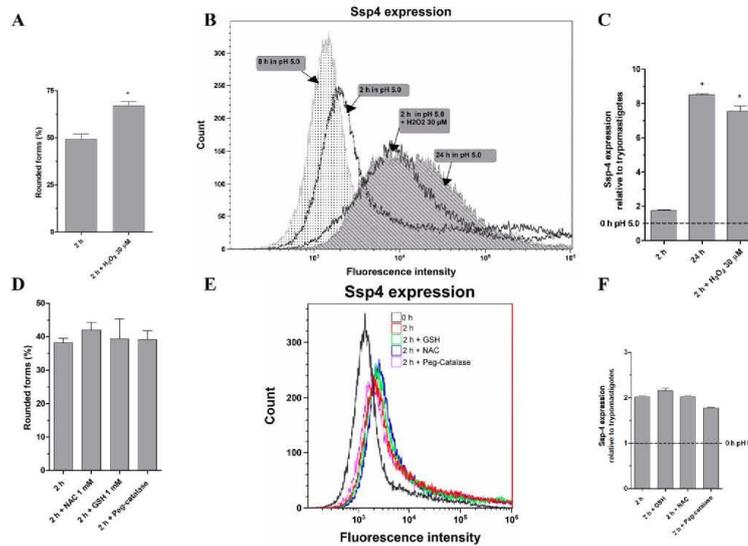


Fig. 1. H_2O_2 elicits trypomastigotes differentiation into amastigotes. (A) Tissue-derived trypomastigotes were incubated in hgDMEM pH 5.0 for 2 h in the absence or in the presence of H_2O_2 (30 μ M). The differentiation process was analyzed by calculating the percentage of parasites that presented rounded forms. Data are expressed as mean \pm standard error (SE) of three different independent experiments performed in duplicate. (B) and (C) Tissue-derived trypomastigotes were incubated in hgDMEM pH 5.0 for 24 h or 2 h, with or without H_2O_2 (30 μ M). Ssp-4 glycoprotein expression was evaluated by flow cytometry using the Ssp-4 surface glycoprotein monoclonal antibody. The histogram is representative of three independent experiments and shows the median of fluorescence intensity (B) and data are expressed as mean \pm standard deviation (SD) of fluorescence intensity normalized to trypanomastigotes (dashed line). Data are representative of two independent experiments performed in duplicate (C). (D) Tissue-derived trypomastigotes were incubated in DMEM pH 5.0 for 2 h in the absence (control) or in the presence of NAC (1 mM), GSH (1 mM) and Peg-Catalase (100 U/mL). The differentiation process was analyzed by calculating the percentage of parasites that presented rounded forms. Data are expressed as mean \pm SE of three different independent experiments performed in duplicate. (E) and (F) Tissue-derived trypomastigotes were incubated in DMEM pH 5.0 for 24 h (amastigotes) or for 2 h in the absence (control) or in the presence of NAC (1 mM), GSH (1 mM) or Peg-Catalase (100 U/mL). Ssp-4 glycoprotein expression was evaluated by flow cytometry using the Ssp-4 surface glycoprotein monoclonal antibody. The histogram is representative of two independent experiments and shows the median of fluorescence intensity (E) and data are expressed as mean \pm SD of fluorescence intensity normalized to trypanomastigotes (dashed line). Data are representative of two independent experiments performed in duplicate (F). Statistical differences among samples were calculated using one-way ANOVA analysis in GraphPad Prism 3.0. * $p < 0.05$ indicates significant difference compared to 2 h.

2.6. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$)

Tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM, Invitrogen Corporation Carlsbad, California, USA), a cationic lipophilic fluorescent probe, was used to measure the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) by flow cytometry on a Gallios apparatus with a 488-nm ion-argon laser. After 60 or 120 min of amastigogenesis induction in hgDMEM pH 5.0, the parasites were incubated with TMRM 50 nM in PBS in the presence or absence of 2 μ M FCCP. The F_{TMRM}/F_{FCCP} ratio was used to normalize the results from the experiments carried out in triplicate, where F_{TMRM} is the median fluorescence intensity of TMRM (F maximal) and F_{FCCP} is the median fluorescence in the presence of FCCP (F minimal). All three independent experiments were performed in duplicate.

2.7. RT-PCR and qPCR

TRizol method (Invitrogen, USA) was used to extract total RNA from amastigogenesis-induced trypomastigotes after 5, 30, 60, 90 or 180 min in acid pH as well as from non-induced trypomastigotes. Total RNA was measured using NanoVue™ (GE Healthcare) and reverse transcription was performed using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's instructions. The quantitative real time PCR (qPCR) using cDNA was amplified using Sybr Green PCR Master Mix (QIAGEN, Germany) and specific primers. The mitochondrial Fe-superoxide dismutase A (TcFeSODA) primer sequence (forward 5' - CGCCGGATGCCCTTAACA - 3' and reverse 5' - CCGGGGTTTTCAAGTCC - 3') and the cytosolic Fe-superoxide dismutase B TcFeSOD B primer sequence (forward 5' - ATGGTC TTCAGCATTCTCC - 3' and reverse 5' - CTTGTCGTAGTGAGCGTCA - 3') were selected from the nucleotide sequence of the TcFeSODA (GenBank accession number [AY864908](#)) and TcFeSOD B (GenBank

accession number [U90723.1](#)), respectively using Primer 3 [19]. Changes in fluorescence were recorded as the temperature was increased from 60 °C to 95 °C to obtain a DNA melting curve. All quantitative measurements were normalized by TCZ and GAPDH as internal controls [20,21]. The expression fold change was calculated by the following equations: $\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{target})} - \Delta C_{T(\text{TCZ or GAPDH})}$; $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{time incubation in minutes})} - \Delta C_{T(\text{non-stimulated - 0 min})}$; expression fold change = $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [22]. All four independent experiments were performed in triplicate at qPCR.

2.8. Statistical analysis

All the data presented here were derived from two to four independent experiments. Statistical evaluation was performed using GraphPad Prism 3. One-way analysis of variance and the Student's *t*-test were used to analyze the statistical differences between the groups. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. H_2O_2 improves amastigogenesis *in vitro*

ROS are considered to be a powerful signaling molecule in the intracellular infection of *T. cruzi* [11,23]. In order to understand the role of ROS in the intracellular infection, we hypothesized the involvement of H_2O_2 in the amastigogenesis, since this stage of infection can occur in the presence of ROS inside macrophages. To confirm this, we induced amastigogenesis *in vitro* in the presence of H_2O_2 and/or antioxidants.

Here, we mimicked the differentiation of trypomastigotes to amastigotes *in vitro* induced by low pH [16]. After 24 h in low pH (DMEM pH 5.0), all the trypomastigotes had been completely differentiated into amastigotes [16]. Since our intention was to investigate the

interference of H_2O_2 on the trypomastigote-amastigote transformation, we induced the amastigogenesis for only 2 h, which is enough time to initiate the differentiation process.

We evaluated the amastigogenesis process and observed that it was more effective in the presence of H_2O_2 , which increased the number of morphological rounded parasites by more than 60% in comparison to the control group (Fig. 1A). Furthermore we compared the expression of the amastigote-specific surface glycoprotein Ssp-4 [24] with the trypomastigotes that were maintained in DMEM pH 7.4 supplemented with 10% FBS. Interestingly, the expression of the Ssp-4 glycoprotein in amastigotes, after 24 h of trypomastigote incubated in DMEM pH 5.0, showed 4.86 times more Ssp-4 glycoprotein expression than the non-incubated parasites (0 h) (Fig. 1B and C). These values were very similar to trypomastigotes incubated for only 2 h in DMEM pH 5.0 and in the presence of H_2O_2 30 μ M (Fig. 1B and C).

The antioxidants NAC, GSH and Peg-Catalase did not change the rounded forms percentage of the trypomastigotes or Ssp-4 glycoprotein expression in comparison to the control group after 2 h of amastigogenesis stimulation in DMEM pH 5.0 (Fig. 1D, E and F).

3.2. Peg-Catalase totally reverses H_2O_2 effect upon amastigogenesis

We investigated whether trypomastigotes incubated with antioxidants concomitantly with H_2O_2 would present impaired amastigogenesis. Even in the presence of GSH or NAC, H_2O_2 was capable of increasing the number of the rounded forms (Fig. 2A) and the Ssp-4 glycoprotein expression (Fig. 2B and C). Peg-Catalase was the only effective antioxidant against the enhancement of amastigogenesis promoted by H_2O_2 (Fig. 2). The analysis of the Ssp-4 glycoprotein expression showed that Peg-Catalase totally reversed H_2O_2 action, returning to the control levels (Fig. 2B and C).

3.3. Amastigogenesis induction is accompanied by ROS production

Despite the fact that exogenous H_2O_2 increased amastigogenesis, induced by low pH, the differentiation of trypomastigotes into amastigotes at the same pH occurs without any extra addition of ROS. Therefore, we investigated whether *Trypanosoma cruzi* produces ROS during amastigogenesis induced by DMEM pH 5.0. First, we used a general reactive oxygen species probe, CM- H_2 DCFDA, in order to evaluate the production of the reactive species after 30, 60, 90, 120 and 180 min of amastigogenesis induction by DMEM pH 5.0. After 30 min of induction, we observed an increase of about 86% in ROS formation, which reached a maximum production at around 60 and 90 min (Fig. 3A).

In order to measure the H_2O_2 production by trypomastigotes during pH-induced differentiation, we used the Amplex[™] UltraRed reagent.

Once more, trypomastigotes were stimulated to differentiate into amastigotes by DMEM pH 5.0 for different times and the maximal peak of H_2O_2 in low pH was achieved after 60 min (Fig. 3B). Thus, *in vitro* amastigogenesis induced by low pH promotes ROS production by the parasites in the first minutes of the differentiation process.

Additionally, we investigated if the mitochondrion could be a site of H_2O_2 production. MitoTEMPO, an antioxidant target to mitochondria, was able to abolish the H_2O_2 production induced by low pH (Fig. 3C), which suggests the involvement of mitochondrion in ROS production during amastigogenesis.

3.4. The Fe-dependent superoxide dismutase mitochondrial (FeSODA) gene expression is higher during *T. cruzi* amastigogenesis induced by low pH

We analyzed the two main isoforms of the iron dependent superoxide dismutase FeSOD enzyme, the mitochondrial (FeSODA) and the cytosolic (FeSODB) (Fig. 4A and B). The quantitative real time PCR technique (qPCR) was used to quantify the changes in the mRNA expression of these FeSODs during amastigogenesis induced by DMEM pH 5.0 in relation to non-stimulated trypomastigotes. GAPDH and TCZ were used as reference genes in order to calculate the fold increase ($2^{\Delta\Delta Ct}$) [20–22].

The FeSODA expression increased more than 70% after 60 min of amastigogenesis induction by low pH in comparison to non-stimulated trypomastigotes (Fig. 4A). Ninety minutes after the induction, the FeSODA expression had increased three times compared to non-stimulated trypomastigotes. Nevertheless, 180 min of amastigogenesis induction had no effect on *T. cruzi* FeSODA mRNA expression, and there was no statistical difference between the stimulated and non-stimulated trypomastigotes (Fig. 4A).

3.5. Mitochondrial involvement during amastigogenesis induced by low pH

In order to evaluate whether the differentiation of trypomastigotes into amastigotes could influence the $\Delta\Psi_m$, the parasites were loaded with the fluorescent probe TMRM, which accumulates in energized mitochondria and then the fluorescence was analyzed by flow cytometry [25]. Fig. 5A shows that amastigogenesis greatly decreased the TMRM positive parasites after 60 min (31%) or 120 min (29.4%) of induction. Similarly, trypomastigotes induced by 60 min or 120 min also showed less TMRM fluorescence (Fig. 5B). The FTMRM/FFCCP was plotted as the $\Delta\Psi_m$ and indicated that amastigogenesis led to depolarization of the $\Delta\Psi_m$ compared to control parasites (Fig. 5C).

The impact of low pH-induced amastigogenesis in the energy metabolism of *T. cruzi* was evaluated by incubating trypomastigotes with DMEM pH 5.0 for 60 min or 120 min and then, the oxygen consumption of the parasites was measured using an Oxygraph-2K; OROBOROS.

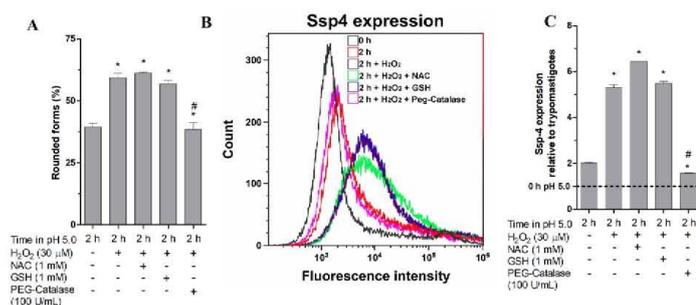


Fig. 2. Peg-Catalase reduces H_2O_2 induced amastigogenesis. Tissue-derived trypomastigotes were incubated in DMEM pH 5.0 for 2 h concomitantly with H_2O_2 (30 μ M) and NAC (1 mM), GSH (1 mM) or Peg-Catalase (100 U/mL). (A) The differentiation process was analyzed by calculating the percentage of rounded form parasites. Data are expressed as mean \pm SE of at least three different independent experiments performed in duplicate. (B) and (C) Ssp-4 surface glycoprotein expression was evaluated by flow cytometry using the Ssp-4 surface glycoprotein monoclonal antibody. The histogram is representative of two independent experiments and shows the median of fluorescence intensity (B) and data are expressed as mean \pm SD of fluorescence intensity normalized to trypomastigotes. Data are representative of two independent experiments performed in duplicate (C). Statistical differences among samples were calculated using one-way ANOVA analysis in GraphPad Prism 3.0. * p < 0.05 indicates significant difference compared to 2 h. # p < 0.05 indicates significant difference compared to the 2 h + 30 μ M H_2O_2 sample.

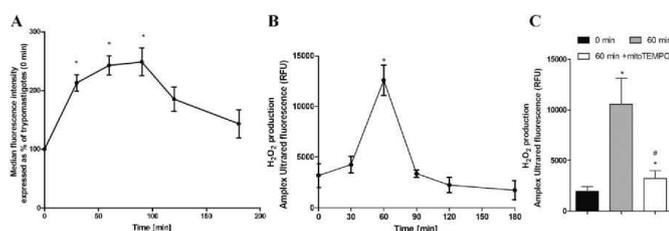


Fig. 3. Kinetics of ROS generation during amastigogenesis. Tissue-derived trypomastigotes were incubated in DMEM pH 5.0 for 30, 60, 90, 120 or 180 min. (A) Intracellular reactive oxygen species were quantified by flow cytometry using a CM-H₂DCFDA probe. (B) H₂O₂ production was quantified using Amplex ultrared reagent. All data are expressed as mean \pm SE of three independent experiments performed in duplicate. (C) Tissue-derived trypomastigotes were incubated in DMEM pH 5.0 for 60 min in the presence or absence of mitoTEMPO and H₂O₂ production was quantified using Amplex ultrared reagent. All data are expressed as mean \pm SE of two independent experiments performed in

duplicate. Statistical differences among samples were calculated using one-way ANOVA analysis in GraphPad Prism 3.0. * $p < 0.05$ indicates significant difference compared to non-stimulated parasites (0 min). # $p < 0.05$ indicates significant difference compared to 60-min group.

DMEM pH 5.0 was chosen to measure respiration parameters since at pH 7.4 the parasites showed lower Electron Transfer System (ETS) capacity profiles (Supplementary Fig. S1). There was a huge difference in the respiration profile of oxygen consumption rates between non-incubated and DMEM pH 5.0 incubated trypomastigotes (Fig. 5D). Besides that, a significant decrease of routine oxygen consumption of the parasites was observed after 60 min (14.3 ± 2.6 nmols/min/mg protein) or 120 min (4.1 ± 1.3 nmols/min/mg protein) of induced amastigogenesis, of about 62% and 89%, respectively, compared to non-stimulated parasites (37.6 ± 2.5 nmols/min/mg protein) (Fig. 5E). The incubation of parasites in low pH also impaired the maximum electron transfer capacity after 60 min (24.3 ± 0.5 nmols/min/mg protein) or 120 min (4.9 ± 1.5 nmols/min/mg protein) of induced differentiation, compared to non-stimulated trypomastigotes (49 ± 5.2 nmols/min/mg protein) (Fig. 5E). The residual oxygen consumption (ROX) was not significantly altered, suggesting that the induction of amastigogenesis by low pH only modulates the oxygen consumption linked to mitochondrial respiration (Fig. 5E).

Our results show that amastigogenesis induction is accompanied by mitochondrial ROS production and reduction of mitochondrial function. This scenario suggests the opening of a mitochondrial permeability transition pore (mPTP), once the literature described this phenomenon after stress conditions such as Ca²⁺ overload or oxidative stress [26,27]. In this context, we investigated if mitochondrial ROS produced after 60 min of amastigogenesis induction is dependent of mPTP opening. In order to test this hypothesis, we challenged the trypomastigotes with a mPTP inhibitor, Cyclosporin A (CsA). We observed that CsA totally revert H₂O₂ production stimulated by amastigogenesis induction (Fig. 6).

4. Discussion

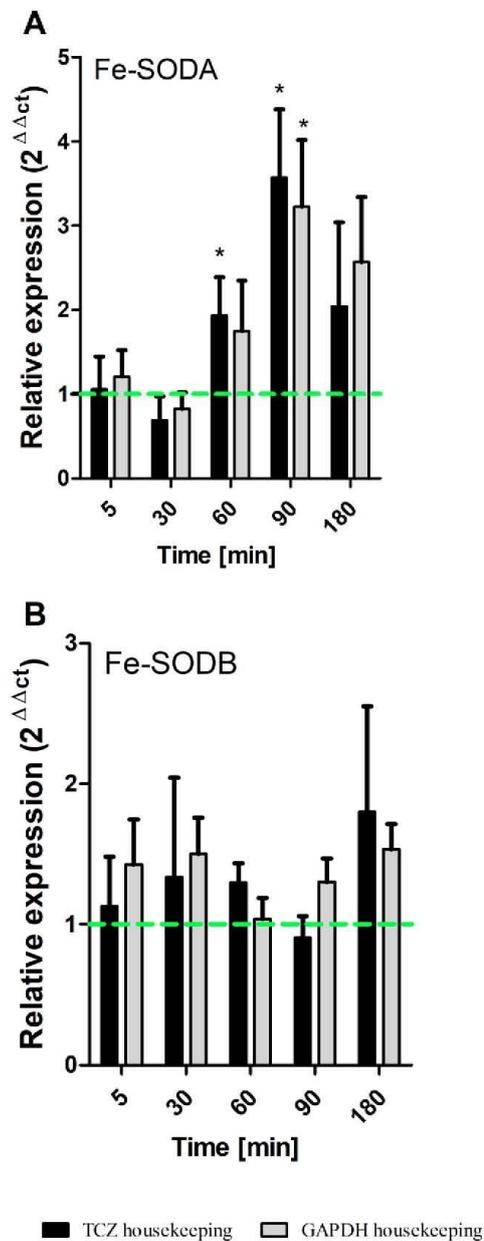
The role of ROS as a microbicidal agent has been well established in the literature over the past decades [28]. Furthermore, NADPH oxidase (NOX-2) from phagocytes is pivotal to kill intracellular pathogens through an event known as respiratory burst or oxidative burst, where large amounts of superoxide anion are produced and dismutated to H₂O₂ by superoxide dismutase activity [28]. The toxicity of ROS is related to damage to different biomolecules such as DNA, lipids and proteins [29]. However, there is growing evidence of a new role for ROS as redox signaling molecules in many physiological processes, including redox homeostasis and cellular signal transduction. By activating proteins such as tyrosine kinases, mitogen-activated protein kinases, protein kinase C, ROS are important mediators of signal transduction pathways [30,31].

The internalization of *T. cruzi* by macrophages stimulates NOX-2 activation but even with O₂⁻ production, the parasites are able to establish an intracellular infection [32]. Paiva et al. showed that, in fact, the oxidative environment of the host cell promotes the intracellular infection by *T. cruzi* [12]. In addition, Goes et al. suggested that ROS triggers the signal for the replication of intracellular

amastigotes [11]. However, these two studies did not evaluate the steps of amastigogenesis and intracellular proliferation of *T. cruzi* separately, so the mechanism whereby ROS or, specifically, H₂O₂ favored the intracellular infection remains unclear.

After the invasion of host cells, trypomastigotes of *T. cruzi* resides briefly in the parasitophorous vacuoles, which has an acidic environment. However, before escaping to the cytosol, parasites can find ROS produced by NOX activation and the low pH of this environment – due to the fusion with lysosomes - is involved in amastigogenesis induction [10,33]. Based on this scenario, we hypothesized that H₂O₂ could contribute to the intracellular infection in the first intracellular differentiation process: amastigogenesis. Considering that H₂O₂ (50 μ M) has been shown not to cause parasite lysis or change the parasite morphology in neutral pH [34], the experiments here were performed in low pH which mimics the pH of the phagolysosome [8].

Indeed, the results here showed an improvement of *in vitro* amastigogenesis by H₂O₂, in both analysis of the morphology changes and the amastigote-specific surface glycoprotein Ssp-4 expression (Fig. 1A, B and C). Unexpectedly, the incubation of trypomastigotes with classical thiol-based antioxidants, GSH and NAC had no significant impact on the *in vitro* differentiation (Fig. 1D, E and F). This suggests that despite the fact that ROS enhance low pH induced amastigogenesis it does not seem to be essential to the process. NAC reacts slowly with H₂O₂ and its antioxidant activity is related to a source of cysteine for GSH synthesis [35,36]. GSH is a precursor of trypanothione (TSH2), the main thiol-based antioxidant system in trypanosomatids [36,37]. Therefore, the lack of success of NAC and GSH in reverting the H₂O₂ effect of amastigogenesis could be explained by the usage of those molecules for trypanothione synthesis. Conversely, only Peg-Catalase, an enzyme that specifically converts H₂O₂ into water and oxygen, was able to revert the H₂O₂ effect by decreasing the differentiation of trypomastigotes and thus suggesting the specificity of H₂O₂ for this process (Fig. 2). These results reinforce the specific role of H₂O₂ in amastigogenesis. Additionally, the possible participation of H₂O₂ in the amastigogenesis process was proposed by the intrinsic production of ROS during the induction of differentiation by low pH. These results suggest that H₂O₂ is a potential signaling molecule during amastigogenesis. Furthermore, ROS has been reported to be involved in the proliferation of amastigotes inside macrophages; however, in that study, the authors used knockout-NADPH oxidase macrophages, which have a low ROS production. In this situation, the trypomastigotes invade the macrophages unable to produce NOX-2 derived ROS, and consequently the amastigogenesis occurs in a less oxidative environment, which could compromise the intracellular infection step, leading to a reduced number of amastigotes inside those macrophages [11]. Hydrogen peroxide has emerged as the major redox metabolite operator in redox sensing, signaling and redox regulation [31]. As a messenger molecule, H₂O₂ diffuses through cells and tissues to initiate immediate cellular effects, such as cell shape changes, initiation of proliferation and recruitment of immune cells [31]. Interestingly, H₂O₂ has been implicated in physiological differentiation process such as stem cells to



smooth muscle cells or chondrocytes [38,39]. In addition, the involvement of ROS in osteoclastogenesis, the differentiation of bone marrow macrophages into osteoclasts, is well established in the literature [35]. H_2O_2 also promotes *Mycobacterium abscessus* growth as well

Fig. 4. qPCR quantification of FeSODA (mitochondrial) and FeSODB (cytosolic) expression during amastigogenesis. Tissue-derived trypomastigotes were incubated in DMEM pH 5.0 to stimulate amastigogenesis for 5, 30, 60, 90 or 180 min. Quantitative real-time PCR was performed on reverse-transcribed cDNA from each time using (A) FeSODA or (B) FeSODB specific primers. The $2^{-\Delta\Delta ct}$ method was used to determine gene expression, using the TCZ expression (black bar) and GAPDH expression (gray bar) as the (housekeeping) and the non-stimulated trypomastigotes (0 min) sample as the calibrator. Data are expressed as mean \pm SE of four independent experiments. Statistical differences among samples were calculated using the Student's *t*-test with the GraphPad Prism 3.0. **p* < 0.05 indicates significant difference compared to non-stimulated trypomastigotes (0 min).

as biofilm formation of both *Streptococcus parasanguinis* and *Acinetobacter oleivorans* [40–42].

In trypanosomatids, H_2O_2 induced the transformation of bloodstream forms of *T. brucei* from proliferative into quiescent, while in *Leishmania* species H_2O_2 triggered promastigote to amastigote differentiation [43,44]. Also, various authors have suggested the involvement of FeSOD during *Leishmania amazonensis* differentiation of promastigotes into amastigotes [45,46]. In *T. cruzi*, Martinez et al. showed the importance of cytosolic FeSOD (FeSODB) in the defense of parasites against $O_2^{\cdot -}$ [13], which made us question if the FeSODs expression would be involved in *T. cruzi* amastigogenesis. Surprisingly, we observed that only the FeSODA expression was significantly increased after the induction of *in vitro* differentiation (Fig. 4) which can explain the inhibition of hydrogen peroxide production by mitoTEMPO, a mitochondrial antioxidant (Fig. 3C), and the low contribution of Peg-Catalase against endogenous H_2O_2 , since this enzyme is not addressed to the mitochondrion. *Leishmania infantum* differentiation to amastigotes *in vitro* induced by low pH led to hyperpolarization of mitochondrion, increased respiratory rates and mitochondrial ROS generation [45]. These results point to the pivotal role of mitochondrial FeSOD (FeSODA) to maintain the mitochondrial redox balance and the production of H_2O_2 as a signaling molecule in amastigote differentiation [45–47]. Due to our results of the expression of mitochondrial FeSODA and inhibition of H_2O_2 production by mitoTEMPO, we investigated the function of mitochondrion during amastigogenesis. Trypomastigote differentiation elicited decreased oxygen consumption and $\Delta\Psi_m$ shortly after 60 min of induced differentiation (Fig. 5). These results could explain, at least in part, the increased ROS production by the differentiating parasites. Differently, the stimulus for amastigogenesis of *Leishmania infantum* by elevating the culture temperature, triggers the hyperpolarization of mitochondrial inner membrane and increases the respiratory rate, promoting ROS generation [45]. In addition, our results are also different from data with epimastigote forms of *T. cruzi* where proliferation induced by heme is associated with mitochondrion-derived ROS from a hyperpolarized mitochondrial membrane potential. Moreover, *T. cruzi* trypomastigotes use ROS as signaling molecules to differentiate but epimastigotes use ROS as a signal to proliferate and not differentiate [48]. In *T. brucei*, the differentiation of epimastigotes to metacyclic trypomastigotes is associated with mitochondrial ROS production and an alternative oxidase [49]. In this context, mitochondrial ROS induction could involve different sites in the mitochondrion [50,51]. Interestingly, our data showed ROS production in the depolarized mitochondrion, an unprecedented result in trypanosomatids. The impairment of both mitochondrial respiratory capacity and mitochondrial membrane potential suggests that the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) could be opened during amastigogenesis *in vitro* [52,53]. Indeed, we observed that mitochondrial H_2O_2 produced after 60 min of amastigogenesis induction is dependent of mPTP opening (Figs. 3 and 6). Despite mPTP has been associated in *T. cruzi* cell death and oxidative stress [27,54], an mPTP inhibitor, Cyclosporine A, showed anti-parasitic activity not only against epimastigotes but also during infection in host cells [55]. Mitochondrial permeability transition pore opening is usually associated

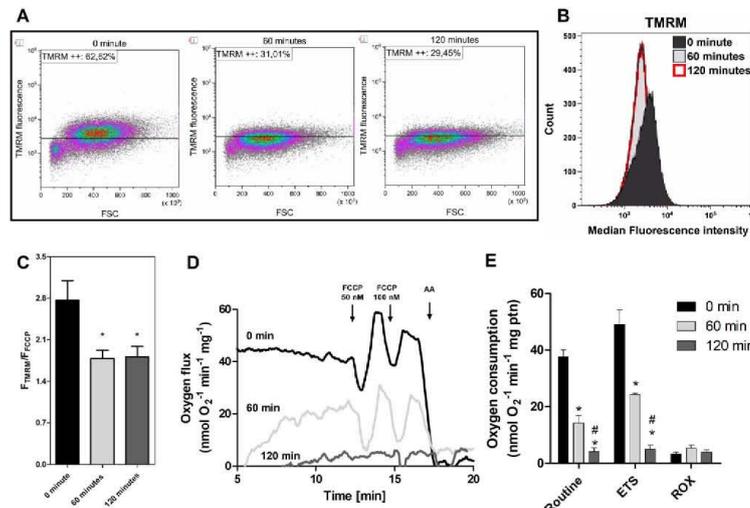


Fig. 5. Low pH stimulus reduces mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and mitochondrial respiratory capacity. Tissue-derived trypanosomastigotes were non-stimulated (0 min) or stimulated to differentiate into amastigotes for 60 min or 120 min. In the flow cytometry analyses, the parasites were incubated with TMRM 50 nM probe for 30 min, the percentage of parasites labelled was measured and plotted with forward scatter (FSC) (A) as well as median of fluorescence intensity (B). Then, the parasites were treated with FCCP 1 μ M for 5 min and the $\Delta\Psi_m$ was measured by the ratio of the median of fluorescence intensity of TMRM in the absence (F_{TMRM}) or presence of FCCP (F_{TMRM}/F_{FCCP}) (C). (D) Parasites were submitted to HRR using an oxygraph 2K OROBOROS for mitochondrial oxygen consumption analysis. Parasites (5×10^7) were incubated in DMEM pH 5 (BASAL). Then, the oxidative phosphorylation uncoupler FCCP (UNCOUPLER) and the complex III inhibitor Antimycin A (2 μ g/ml) were added to determine the residual oxygen consumption (ROX). Data of (E) Routine respiration and the capacity of the electron

transfer system, ETS, were corrected for residual oxygen consumption, ROX. Data are expressed as mean \pm SE of three independent experiments performed in duplicate. Statistical differences among samples were calculated using one-way ANOVA in GraphPad Prism 3.0. * $p < 0.05$ significant difference compared to non-stimulated trypanosomastigotes (0 min). # $p < 0.05$ indicates significant difference compared to the 60-min-group.

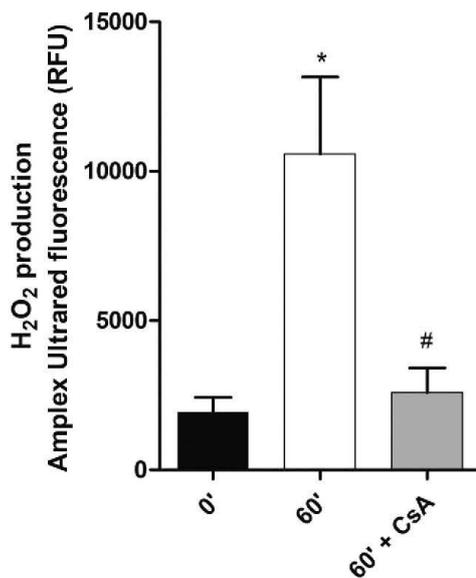


Fig. 6. CsA inhibit H₂O₂ production in the amastigogenesis “in vitro”. Tissue-derived trypanosomastigotes were incubated in DMEM pH 5.0 for 60 min in the presence or absence of CsA (500 nM) and H₂O₂ production was quantified using Amplex ultrared reagent. All data are expressed as mean \pm SE of two independent experiments performed in duplicate. Statistical differences among samples were calculated using one-way ANOVA analysis in GraphPad Prism 3.0. * $p < 0.05$ indicates significant difference compared to non-stimulated parasites (0 min) and # $p < 0.05$ indicates significant difference compared to 60 min group.

with mitochondrial damage and cell death but reversible opening has been associated with physiological roles such as heart development [56]. Furthermore, ROS formed in the first 30 min of amastigogenesis could contribute to mPTP opening and stimulate more ROS production by the parasite mitochondrion, this phenomenon has been termed “ROS-induced ROS release” [50]. However, future studies are needed to confirm the mPTP opening as well as its role during amastigogenesis.

In conclusion, our results suggest that during amastigogenesis inside a parasitophorous vacuole, the low pH promotes an intense modulation of the mitochondrial function in the trypanosomastigotes, decreasing the oxygen consumption and mitochondrial membrane potential as well increasing the mitochondrial superoxide dismutase expression, raising intracellular levels of H₂O₂, which can act as an enhancer for *T. cruzi* intracellular differentiation (Fig. 7).

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2020.165951>.

CRedit authorship contribution statement

Jéssica Isis Oliveira de Paula: Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Jonathan da Silva Pinto:** Methodology. **Ana Rossini:** Formal analysis, Methodology, Supervision, Writing - review & editing. **Natália Pereira Nogueira:** Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Writing - review & editing. **Marcia Cristina Paes:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Writing - review & editing.

Declaration of competing interest

The authors have declared that no competing interests exist.

Acknowledgements

This study was financed in part by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) through a grant from Cientista

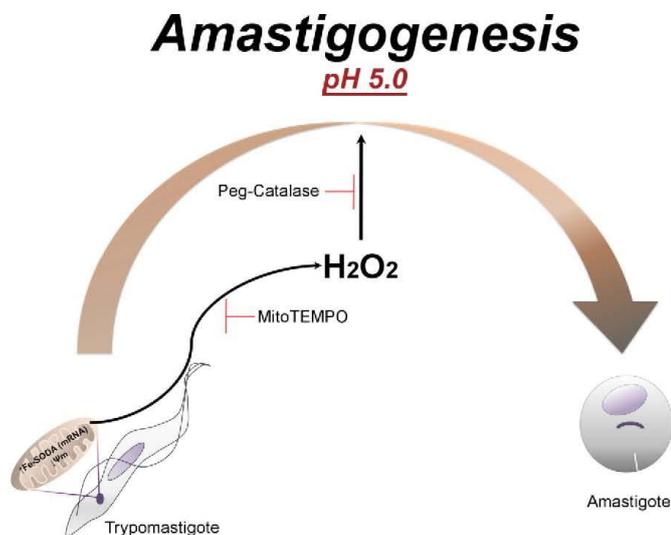


Fig. 7. Overview of amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi* and hydrogen peroxide. The induction of amastigogenesis *in vitro* by low pH reduces mitochondrial function and increases Fe-SODA expression. In this context, hydrogen peroxide produced inside of mitochondrion promotes the differentiation of trypomastigotes to amastigotes.

do Nosso Estado (CNE) E-26/203.213/2015 (awarded to MCP); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 (awarded to JIOP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) through grant 421676/2016-7 (awarded to NPN). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

We thank Dr. Renato A. Mortara and his research group from UNIFESP for kindly providing us with the 2C2 Ssp-4 glycoprotein antibody.

References

- [1] World Health Organization, Chagas disease (American trypanosomiasis), Fact Sheet. (2019) 1. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (accessed June 25, 2019).
- [2] G.A. Schmunis, Z.E. Yadon, Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem, *Acta Trop.* 115 (2010) 14–21, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003>.
- [3] A. Requena-Méndez, E. Aldasoro, E. de Lazzari, E. Sicuri, M. Brown, D.A.J. Moore, J. Gascon, J. Muñoz, Prevalence of Chagas disease in Latin American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9 (2015) e0003540, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003540>.
- [4] A. Rassi, A. Rassi, J.A. Marin-Neto, Chagas disease, *Lancet.* 375 (2010) 1388–1402, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X).
- [5] L.O. Andrade, N.W. Andrews, Opinion: the *Trypanosoma cruzi* - host-cell interplay: location, invasion, retention, *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (2005) 819–823, <https://doi.org/10.1038/nrmicro1249>.
- [6] C.L. Olson, K.C. Nadeau, M.A. Sullivan, A.G. Winquist, J.E. Donelson, C.T. Walsh, D.M. Engman, Molecular and biochemical comparison of the 70-kDa heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi*, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 3868–3874.
- [7] N.P. Nogueira, F.M.S. Saraiva, P.E. Sultano, P.R.B.B. Cunha, G.A.T. Laranja, G.A. Justo, K.C.C. Sabino, M.G.P. Coelho, A. Rossini, G.C. Atella, M.C. Paes, Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: redox status, *PLoS One* 10 (2015) e0116712, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116712>.
- [8] N. V Tomlinson S, Vandekerckhove F, Frevert U, The induction of *trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH, *Parasitology.* 110 (1995) 547–554, <https://doi.org/10.1017/S0031182000065264>.
- [9] V.T. Contreras, M.C. Navarro, A.R. De Lima, R. Arteaga, F. Duran, J. Askue, Y. Franco, Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97 (2002) 1213–1220, <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000800025>.
- [10] L. Piacenza, M.N. Alvarez, G. Peluffo, R. Radi, Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection, *Curr. Opin. Microbiol.* 12 (2009) 415–421, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2009.06.011>.
- [11] G.R. Goes, P.S. Rocha, A.R.S. Diniz, P.H.N. Aguiar, C.R. Machado, L.Q. Vieira, *Trypanosoma cruzi* needs a signal provided by reactive oxygen species to infect macrophages, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (2016) e0004555, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004555>.
- [12] C.N. Paiva, D.F. Feijó, F.F. Dutra, V.C. Cameiro, G.B. Freitas, L.S. Alves, J. Mesquita, G.B. Fortes, R.T. Figueiredo, H.S.P. Souza, M.R. Fantappiè, J. Lannes-Vieira, M.T. Bozza, Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 2531–2542, <https://doi.org/10.1172/JCI58525>.
- [13] A. Martínez, C. Prolo, D. Estrada, N. Rios, M.N. Alvarez, M.D. Piñeyro, C. Robello, R. Radi, L. Piacenza, Cytosolic Fe-superoxide dismutase safeguards *Trypanosoma cruzi* from macrophage-derived superoxide radical, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116 (2019) 8879–8888, <https://doi.org/10.1073/pnas.1821487116>.
- [14] D. Estrada, G. Specker, A. Martínez, P.P. Dias, B. Hissa, L.O. Andrade, R. Radi, L. Piacenza, Cardiomyocyte diffusible redox mediators control *Trypanosoma cruzi* infection: role of parasite mitochondrial iron superoxide dismutase, *Biochem. J.* 475 (2018) 1235–1251, <https://doi.org/10.1042/bj20170698>.
- [15] A. Martínez, G. Peluffo, A.A. Petruk, M. Hugo, D. Piñeyro, V. Demicheli, D.M. Moreno, A. Lima, C. Bathiány, R. Durán, C. Robello, M.A. Martí, N. Larrioux, A. Buschiazio, M. Trujillo, R. Radi, L. Piacenza, Structural and molecular basis of the peroxynitrite-mediated nitration and inactivation of *Trypanosoma cruzi* iron-superoxide dismutases (Fe-SODs) A and B, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 12760–12778, <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545590>.
- [16] L.A. Hernández-Osorio, C. Márquez-Duenas, L.E. Florencio-Martínez, G. Ballesteros-Rodea, S. Martínez-Calvillo, R.G. Manning-Cela, Improved method for *in vitro* secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms, *J. Biomed. Biotechnol.* 2010 (2010) 1–10, <https://doi.org/10.1155/2010/283842>.
- [17] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [18] E. Gnaiger, Mitochondrial pathways and respiratory control an introduction to OXPHOS analysis, *Mitochondrial Physiol. Netw.* (2014) 1–80.
- [19] S. Rozen, H. Skaletsky, Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, *Methods Mol. Biol.* 132 (2000) 365–386.
- [20] C. Martins, C.S. Baptista, S. Jenne, G.C. Cerqueira, D.C. Bartholomeu, B. Zingales, Genomic organization and transcription analysis of the 195-bp satellite DNA in *Trypanosoma cruzi*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 160 (2008) 60–64, <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.03.004>.
- [21] Y. Takagi, Y. Akutsu, M. Doi, K. Funikawa, Utilization of proliferable extracellular amastigotes for transient gene expression, drug sensitivity assay, and CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in *Trypanosoma cruzi*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13 (2019). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007088>.
- [22] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method, *Methods.* 25 (2001) 402–408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [23] C.N. Paiva, M.T. Bozza, Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014) 1000–1037, <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5447>.
- [24] N.W. Andrews, K.S. Hong, E.S. Robbins, V. Nussenzeiwig, Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*, *Exp. Parasitol.* 64 (1987) 474–484.
- [25] R.C. Seaduto, L.W. Grotjohann, Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives, *Biophys. J.* 76 (1999) 469–477.

- [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77214-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77214-0).
- [26] M. Crompton, H. Ellinger, A. Costi, Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress, *Biochem. J.* 255 (1988) 357–360.
- [27] P.L. Bustos, A.E. Perrone, N. Mildberger, M. Postan, J. Bua, Oxidative stress damage in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is inhibited by cyclosporin A, *Parasitology*. 142 (2015) 1024–1032, <https://doi.org/10.1017/S0031182015000232>.
- [28] Y. Yang, A.V. Bazhin, J. Werner, S. Karakhanova, Reactive oxygen species in the immune system, *Int. Rev. Immunol.* 32 (2013) 249–270, <https://doi.org/10.3109/08830185.2012.755176>.
- [29] R. Mittler, ROS are good, *Trends Plant Sci.* 22 (2017) 11–19, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>.
- [30] Y.J. Suzuki, H.J. Forman, A. Sevanian, Oxidants as stimulators of signal transduction, *Free Radic. Biol. Med.* 22 (1997) 269–285.
- [31] H.S. Marinho, C. Real, L. Cyme, H. Soares, F. Antunes, Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors, *Redox Biol.* 2 (2014) 535–562, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.02.006>.
- [32] M.N. Alvarez, G. Peluffo, L. Piacenza, R. Radi, Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 6627–6640, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.167247>.
- [33] B.N. Salassa, P.S. Romano, Autophagy: a necessary process during the *Trypanosoma cruzi* life-cycle, *Virulence*. 10 (2018) 1–10, <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1543517>.
- [34] F.R. Gadelha, C.C. Gonçalves, E.C. Mattos, M.J.M. Alves, M.D. Piñeyro, C. Robello, E.F. Peloso, Release of the cytosolic trypanoxin peroxidase into the incubation medium and a different profile of cytosolic and mitochondrial peroxiredoxin expression in H₂O₂-treated *Trypanosoma cruzi* tissue culture-derived trypomastigotes, *Exp. Parasitol.* 133 (2013) 287–293, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.12.007>.
- [35] O.I. Aruoma, B. Halliwell, B.M. Hoey, J. Butler, The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid, *Free Radic. Biol. Med.* 6 (1989) 593–597, [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90066-X](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90066-X).
- [36] R.L. Krauth-Siegel, M.A. Comini, Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1780 (2008) 1236–1248, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.006>.
- [37] R.L. Krauth-Siegel, S.K. Meiering, H. Schmidt, The parasite-specific trypanothione metabolism of trypanosoma and leishmania, *Biol. Chem.* 384 (2003) 539–549, <https://doi.org/10.1515/BC.2003.062>.
- [38] Q. Xiao, Z. Luo, A.E. Pepe, A. Margariti, L. Zeng, Q. Xu, Embryonic stem cell differentiation into smooth muscle cells is mediated by Nox4-produced H₂O₂, *Am. J. Physiol. Physiol.* 296 (2009) C711–C723, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00442.2008>.
- [39] F. Goudarzi, A. Mohammadipour, M. Bahabadi, M.T. Goodarzi, A. Sarveazad, I. Khodadadi, Hydrogen peroxide: a potent inducer of differentiation of human adipose-derived stem cells into chondrocytes, *Free Radic. Res.* 52 (2018) 763–774, <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1466121>.
- [40] R.E. Oberley-Deegan, B.W. Rebits, M.R. Weaver, A.K. Tollefson, X. Bai, M. McGibney, A.R. Ovrutsky, E.D. Chan, J.D. Crapo, An Oxidative Environment Promotes Growth of *Mycobacterium Abscessus*, (2010), <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.026>.
- [41] D. Duan, J.A. Scofield, X. Zhou, H. Wu, Fine-tuned production of hydrogen peroxide promotes biofilm formation of streptococcus parasanguinis by a pathogenic cohabitant *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Environ. Microbiol.* 18 (2016) 4023–4036, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13425>.
- [42] I.A. Jang, J. Kim, W. Park, Endogenous hydrogen peroxide increases biofilm formation by inducing exopolysaccharide production in *Acinetobacter oleivorans* DR1, *Sci. Rep.* 6 (2016). doi:<https://doi.org/10.1038/srep21121>.
- [43] M. Saklivia, G. Ceballos-Pérez, J.M. Bart, M. Navarro, The AMPK α 1 pathway positively regulates the developmental transition from proliferation to quiescence in *Trypanosoma brucei*, *Cell Rep.* 17 (2016) 660–670, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.041>.
- [44] Y.A. Khan, N.W. Andrews, B. Mittra, ROS regulate differentiation of visceralizing *Leishmania* species into the virulent amastigote form, *Parasitol. Open.* 4 (2018). doi:<https://doi.org/10.1017/pao.2018.15>.
- [45] B. Mittra, M.F. Laranjeira-Silva, D.C. Miguel, J. Perrone Bezerra De Menezes, N.W. Andrews, The iron-dependent mitochondrial superoxide dismutase SODA promotes *Leishmania* virulence, *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 12324–12338, doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.772624>.
- [46] B. Mittra, M. Cortez, A. Haydock, G. Ramasamy, P.J. Myler, N.W. Andrews, Iron uptake controls the generation of *Leishmania* infective forms through regulation of ROS levels, *J. Gen. Physiol.* 141 (2013) 17, <https://doi.org/10.1085/jgp.141301a7>.
- [47] B. Mittra, M.F. Laranjeira-Silva, J. Perrone Bezerra de Menezes, J. Jensen, V. Michailovsky, N.W. Andrews, A trypanosomatid iron transporter that regulates mitochondrial function is required for *Leishmania amazonensis* virulence, *PLoS Pathog.* 12 (2016) e1005340, doi:<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005340>.
- [48] N.P. Nogueira, F.M.S. Saraiva, M.P. Oliveira, A.P.M. Mendonça, J.D.F. Inacio, E.E. Almeida-Amaral, R.F. Menna-Barreto, G.A.T. Laranja, E.J.L. Torres, M.F. Oliveira, M.C. Paes, Heme modulates *Trypanosoma cruzi* bioenergetics inducing mitochondrial ROS production, *Free Radic. Biol. Med.* 108 (2017) 183–191, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.027>.
- [49] E. Doleželová, M. Kunzová, M. Dejung, M. Levin, B. Panicucci, C. Regnault, C.J. Janzen, M.P. Barrett, F. Butter, A. Žiková, Cell-based and multi-omics profiling reveals dynamic metabolic repurposing of mitochondria to drive developmental progression of *Trypanosoma brucei*, *PLoS Biol.* 18 (2020) e3000741, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000741>.
- [50] D.B. Zorov, C.R. Filburn, L.O. Klotz, J.L. Zweier, S.J. Sollott, Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 1001–1014, <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1001>.
- [51] T. Mráček, E. Holzerová, Z. Drahotová, N. Kovářová, M. Vrbáčková, P. Ješina, J. Houštek, ROS generation and multiple forms of mammalian mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1837 (2014) 98–111, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.08.007>.
- [52] A. V. Kuznetsov, S. Javadov, V. Saks, R. Margreiter, M. Grimm, Synchronism in mitochondrial ROS flashes, membrane depolarization and calcium sparks in human carcinoma cells, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1858 (2017) 418–431, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.03.001>.
- [53] J. Teixeira, C. Oliveira, F. Cagide, R. Amorim, J. Garrido, F. Borges, P.J. Oliveira, Discovery of a new mitochondrial permeability transition pore (mPTP) inhibitor based on gallic acid, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 33 (2018) 567–576, <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1442831>.
- [54] P.L. Bustos, B.J. Volta, A.E. Perrone, N. Mildberger, J. Bua, A homolog of cyclophilin D is expressed in *Trypanosoma cruzi* and is involved in the oxidative stress-damage response, *Cell Death Discov.* 3 (2017) 16092, <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.92>.
- [55] J. Búa, L.E. Fichera, A.G. Fuchs, M. Potenza, M. Dubin, R.O. Wenger, G. Moretti, C.M. Scabone, A.M. Ruiz, Anti-*Trypanosoma cruzi* effects of cyclosporin A derivatives: possible role of a P-glycoprotein and parasite cyclophilins, *Parasitology*. 135 (2008) 217–228, <https://doi.org/10.1017/S003118200700371X>.
- [56] M.J. Pérez, R.A. Quintanilla, Development or disease: duality of the mitochondrial permeability transition pore, *Dev. Biol.* 426 (2017) 1–7, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.04.018>.