

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE *Trypanosoma caninum* E
CÉLULAS MACROFÁGICAS: ASPECTOS MORFOLÓGICOS,
BIOLÓGICOS E ULTRAESTRUTURAIIS

KÁTIA CRISTINA SILVA NASCIMENTO

Rio de Janeiro
Agosto de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Kátia Cristina Silva Nascimento

Estudo da interação entre *Trypanosoma caninum* e células macrofágicas:
aspectos morfológicos, biológicos e ultraestruturais

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

Orientadora: Dr^a. Juliana Helena da Silva Barros

Rio de Janeiro

Agosto de 2020

Nascimento, Kátia Cristina Silva.

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE *Trypanosoma caninum* E CÉLULAS MACROFÁGICAS: ASPECTOS MORFOLÓGICOS, BIOLÓGICOS E ULTRAESTRUTURAIS / Kátia Cristina Silva Nascimento. - Rio de Janeiro, 2020.

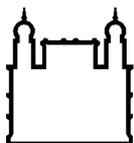
xxviii, 146f f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientadora: Juliana Helena da Silva Barros.

Bibliografia: f. 122-132

1. Cultivo celular. 2. Macrófagos. 3. Epimastigota aflagelar. 4. Microscopia de campo claro. 5. Microscopia eletrônica. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Kátia Cristina Silva Nascimento

**Estudo da interação entre *Trypanosoma caninum* e células
macrofágicas: aspectos morfológicos, biológicos e ultraestruturais**

ORIENTADORA: Dr^a. Juliana Helena da Silva Barros

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Suzana Corte-Real Faria - Presidente (IOC-FIOCRUZ)

Prof. Dr. Rodrigo Caldas Menezes (INI-FIOCRUZ)

Prof. Dr. Helena Keiko Toma (UFRJ)

Prof. Dr. Luciana de Freitas Campos Miranda (INI-FIOCRUZ)

Prof. Dr. Suzete Araujo Oliveira (UFF)

Rio de Janeiro, 27 de Agosto de 2020

À minha família e aos amigos mais que queridos. Em especial: meu príncipe Luigi Gabriel, ao meu esposo, Alessandro e a minha mãe Severina. Amo vocês!

Agradecimentos

Eu costumo achar a vida parecida como uma roda gigante. Em alguns momentos estamos vendo e passando por tudo de cima e em outros estamos na parte de baixo. No entanto tudo é cíclico e o que torna esses eventos diferentes são as companhias que se encontram ao nosso lado. E graças a Deus sempre fui agraciada!

Sempre foi **Deus** e para Deus.... Sempre pedi o que fosse da sua vontade e Deus colocou pessoas mais que especiais na minha vida que fizeram toda a diferença nessa trajetória. Não tinha como ser tão esplêndido se não fosse pela minha rainha **Severina da Silva**, a minha mãe, que sozinha criou seis crianças nada tranquilas, a começar por mim. Minha infância foi a melhor possível ao lado deles, dos meus irmãos que foram sempre minha motivação **Leandro Nascimento**, **Maria Nascimento**, **Ana Cláudia Nascimento**, **Maria Zilda Nascimento** e **Severino Nascimento**. Mas a minha família só se completou quando conheci meu digníssimo esposo, **Alessandro Pinheiro** e tivemos nosso frutinho do amor **Luigi Gabriel**, minha razão de vida. Minha estrela maior. Cada sorriso dele é como o sol aquecendo após grandes dias de inverno fervoroso. Não tem preço. E quando meus pimpolhos estão reunidos, **Arthur**, meu sobrinho e afilhado, **Laura**, **Victória** e **Giovana**, fazendo aquela bagunça gostosa. A vida nos traz tanta coisa boa e eu posso dizer que os melhores amigos eu tenho. Não tem como ter amigos como **Drielle Amaral**, **João Magno dos Santos**, **Angélica Assis**, **Juliana Sant`Anna**, amigos adquiridos no meu primeiro emprego, adquiridos para a vida toda. Ali conheci **Kelli da Silva**, que é minha madrinha de crisma e hoje sou madrinha do seu príncipe, meu lindo **Heitor**.

À minha amiga **Jéssica Brigitte**, que faz parte da minha história. Meus vizinhos que são da minha família, são amigos para todas as horas **Eliete Marins**, **Marcos Paulo**, **Maridete Marins** que representam todos os demais.

Em mais um passo da minha vida durante a graduação tive a sorte de ter pessoas incríveis na labuta do dia a dia: **Bianca Reigoto**, **Djane Oliveira**, **Dayane Natividade**, **Bruna Santos**, **Glauciane Evangelista**, **Ana Carolina Moreira**, **Maria Luiza Salles**, **Lívia Jordão** e minha amiga **Rosana Baier**, que me ensinaram muito sobre partilha e companheirismo. Dentre tantas pessoas a minha querida **Tatiana Freitas**, minha amiga de todos os sufocos e de

motivação. Muito guerreira que sempre segurou a minha mão e seguimos juntas. Muito orgulho de onde chegamos.

Durante a faculdade iniciei no programa de iniciação científica (PIBIC), no LABTRIP, meu sonho se realizando da melhor forma possível, em um laboratório onde fui acolhida, que é cheio de pessoas que se preocupam com o outro, é nossa família científica. Só tenho a agradecer à **Dr^a Ana Maria Jansen** por todo o ensinamento e palavras que me motivaram. A **Dr^a Samanta Xavier** por todo o aporte. E logo após iniciei como aluna do Programa de iniciação tecnológica (PIBIT) e tive a oportunidade de ser orientada **pela Dr^a Juliana Barros**, a querida Ju, simples e a quem sou imensamente grata por toda dedicação e aprendizado que me foi prestado, sempre com zelo, clareza e muita parceria. Muito obrigada pela incrível relação que possuímos e por sempre estar presente. Essa etapa foi substancial para minha continuidade na vida acadêmica. E não posso deixar de lembrar das minhas *Bobs* **Ana Carolina, Larissa Sousa, Wanessa Souza, Thainá Delecrode**, sempre com assuntos leves e joviais, tão lindas e amadas. E aí veio o mestrado, etapa desafiadora, mas sabia que teria o apoio da minha orientadora, **Juliana Barros** que mais uma vez embarcou comigo dessa desafiadora etapa. E pode apostar que cada segundo da nossa interação foi essencial para o desenvolvimento do projeto. Sempre esteve comigo durante os experimentos ou os discutindo. Me dando todo o suporte científico e emocional. Foi e é meu porto seguro, a quem aprecio pelo lado profissional e pessoal.

Sou grata por todo o companheirismo das migs **Maria Augusta Dario, Cristiane Varella, Alice Berbegier e Élide Brandão**, que me proporcionaram muitas risadas gostosas. E a todos do Labtrip, cada um tem um lugar especial no meu coração. O **Bruno Alves** que sempre me fez rir mesmo as sete e pouca da manhã, ao **Marlon Silva** por todo o suporte no microscópio de campo claro e pelas conversas e **Lorrayne Britto** por toda sua doçura, com palavras acalentadoras.

Não posso deixar de agradecer imensamente aos laboratórios **VIGILEISH** e **LBE** por nossa parceria e a cada membro que estiveram comigo ao longo desses dois anos. Aprendi muito com vocês, cada membro contribuiu imensamente na realização desse projeto. Em especial a **Célia Moreira, Jéssica e Isabela** que me fizeram rir e me ajudaram muito e a **Sandra Maria Souza**, a quem sou extremamente agradecida por toda contribuição técnica, emocional e

por toda a parceria. A quem irei levar para a vida toda. Às **Dras. Aline Fagundes, Luciana Miranda, Suzana Corte-Real**. A todos da plataforma de microscopia eletrônica da Fiocruz em especial ao **Roger**, que me sempre esteve de bom grado nas análises e ao **Rômulo**, que juntos foram essenciais nas minhas análises de microscopia eletrônica.

Agradeço imensamente ao Programa de Pós graduação em Biologia Parasitária por todo o suporte e apoio em especial a **Rita Gomes** que com toda a sua doçura e atenção nos auxilia e nos acalma em meio a correria. A todos os docentes aos quais tive a honra de participar das suas aulas e aos meus colegas. E for fim, agradeço às agências de fomento: a VPEIC-Fiocruz e a Capes.

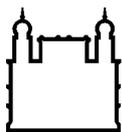
“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

Obrigada a todos! Nada seria possível sem a participação de cada um.

Obrigada Deus por colocar anjos na minha vida!

Dificuldades são estímulos para os
que sabem lutar!
(Almir de Freitas Dutra)

A vida é feita de acasos,
circunstâncias e contingências, mas
para se obter bons resultados tem
que se trabalhar sério.
(José Olímpio)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

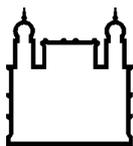
Estudo da interação entre *Trypanosoma caninum* e células macrofágicas: aspectos morfológicos, biológicos e ultraestruturais

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Kátia Cristina Silva Nascimento

Trypanosoma caninum é um tripanosomatídeo até então isolado apenas da cultura de pele íntegra de cães. No cultivo axênico apresenta as formas evolutivas: epimastigota aflagelar e flagelar, tripomastigota e esferomastigota. Inúmeros aspectos sobre *T. caninum* ainda precisam ser investigados, dentre eles em relação ao potencial infectivo das formas evolutivas. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar aspectos morfológicos, biológicos e ultraestruturais da interação de *T. caninum* com células macrofágicas *in vitro*. Inicialmente, foi realizada curva de crescimento, análise e quantificação das formas evolutivas de *T. caninum* em meio axênico e em cocultivo com a linhagem celular DH82. Em seguida, foi realizada análise ultraestrutural das formas de *T. caninum* cultivadas em meio axênico e cocultivo com linhagem celular DH82. Com intenção de conhecer o potencial infectivo da forma epimastigota aflagelar foi realizado estudo de interação *T. caninum* com a linhagem de macrófago canino DH82 e macrófago peritoneal (M ϕ) de camundongos BALB/c, em duas condições: em meio DMEM F12 suplementado com SFB e a outra com meio suplementado com BSA. Toda cinética ocorreu em 7 tempos: 15, 30 e 45 minutos e 2, 6, 24 e 48 horas. A análise da interação foi realizada por microscopia óptica de campo claro (MCC), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET). Para análise quantitativa e estatística foram contabilizados total de células infectadas, com parasitos aderidos e parasitos interiorizados por células infectadas. A curva de crescimento de *T. caninum* em meio axênico e em cocultivo apresentaram o mesmo perfil, porém no meio axênico foi observada no pico da fase exponencial quase quatro vezes mais parasitos que no cocultivo. Diferente do cultivo axênico, no qual foi observada apenas as formas epimastigotas, durante o cocultivo com a linhagem celular DH82 foi observada diferenciação para forma tripomastigota e esferomastigota. A análise ultraestrutural demonstrou que *T. caninum* possui estruturas descritas para as espécies de tripanosomatídeos, com destaque para inúmeros corpúsculos lipídicos ao longo do corpo. Em relação a interação *T. caninum*-macrófagos foram obtidos resultados inéditos: *T. caninum* é capaz de infectar células, a forma epimastigota aflagelar é infectiva para macrófagos e foi verificada a existência de formas amastigotas de *T. caninum*. Já no tempo de 15 minutos, a forma epimastigota aflagelar de *T. caninum* adere e entra nas células, rapidamente, modifica-se para a forma amastigota dentro do vacúolo parasitóforo. Dentro deste vacúolo ocorre divisão de amastigotas. Algumas amastigotas são digeridas pelas células e outras viáveis são liberadas, como observado por MET nos tempos de 45 minutos em interação com M ϕ e no tempo de 6 horas na interação com a linhagem DH82. No meio extracelular, em algumas amastigotas ocorre mudança para epimastigota aflagelar e outras interagem com a célula para reinfecção. Foi observada diferença significativa em relação a infecção entre as duas células e em relação a células nas quais ocorriam adesão e infecção simultaneamente na condição com SFB. Esta dissertação apresenta resultados inéditos sobre o conhecimento dos eventos ocorridos durante a interação *T. caninum*-células que são úteis no entendimento sobre aspectos biológicos e da relação parasito-hospedeiro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Study of the interaction between *Trypanosoma caninum* cells and macrophages:
morphological, biological and ultrastructural aspects** ABSTRACT

MASTER DISSERTATION THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Kátia Cristina Silva Nascimento

Trypanosoma caninum is a trypanosomatid hitherto isolated only from the culture of intact dog skin. In axenic cultivation it presents the evolutionary forms: aflagellar and flagellar epimastigote, trypomastigote and spheromastigote. Several aspects about *T. caninum* still need to be investigated, among them in relation to the infectious potential of evolutionary forms. In this context, the objective of this study was to evaluate morphological, biological and ultrastructural aspects of the interaction of *T. caninum* with macrophage cells *in vitro*. Initially, a growth curve, analysis and quantification of the evolutionary forms of *T. caninum* were performed in axenic medium and in co-cultivation with the cell line DH82. Then, an ultrastructural analysis of the forms of *T. caninum* cultivated in axenic and co-cultured media with cell line DH82 was performed. With the intention of knowing the infectious potential of the aflagellar epimastigote form, a *T. caninum* interaction study was performed with the canine macrophage DH82 and peritoneal macrophage (M ϕ) strain of BALB / c mice, under two conditions: in DMEM F12 medium supplemented with FBS and the other with medium supplemented with BSA. All kinetics occurred in 7 times: 15, 30 and 45 minutes and 2, 6, 24 and 48 hours. The interaction analysis was carried out by light field optical microscopy, scanning electron microscopy (SEM) and transmission (TEM). For quantitative and statistical analysis, total infected cells were counted, with adherent parasites and parasites internalized by infected cells. The growth curve of *T. caninum* in axenic and co-cultured environments showed the same profile, but in the axenic environment, at the peak of the exponential phase, almost four times more parasites were observed than in co-cultivation. Unlike axenic culture, in which only epimastigote forms were observed, during co-cultivation with the DH82 cell line, differentiation into trypomastigote and spheromastigote forms was observed. The ultrastructural analysis showed that *T. caninum* has structures described for the trypanosomatid species, with emphasis on numerous lipid corpuscles throughout the body. Regarding the *T. caninum*-macrophage interaction, unprecedented results were obtained: *T. caninum* is capable of infecting cells, the aflagellar epimastigote form is infectious for macrophages and the existence of amastigote forms of *T. caninum* was verified. Within 15 minutes, the aflagellar epimastigote form of *T. caninum* adheres and enters the cells, quickly changes to the amastigote form within the parasitophore vacuole. Within this vacuole there is a division of amastigotes. Some amastigotes are digested by cells and others viable are released, as observed by TEM in 45 minutes in interaction with M ϕ and in 6 hours in interaction with the DH82 strain. In the extracellular environment, in some amastigotes there is a change to aflagellar epimastigote and others interact with the cell for reinfection. A significant difference was observed in relation to infection between the two cells and in relation to cells in which adhesion and infection occurred simultaneously in the condition with FBS. This dissertation presents unprecedented results on the knowledge of the events that occurred during *T. caninum*-cell interaction that are useful in understanding biological aspects and the parasite-host relationship.

Índice

Resumo	ix
Abstract	x
Índice de figuras	xiii
Índice de tabelas	xxv
Índice de quadro	xxvi
Índice de gráficos	xxvii
Lista de siglas e abreviatura	xxviii
1 Introdução	xxviii
1.1 Gênero <i>Trypanosoma</i>	1
1.1.1 Aspectos morfológicos e ultraestruturais	2
1.2 <i>Trypanosoma caninum</i>	6
1.3 Estudo de interação <i>Trypanosoma</i> x célula	9
1.3.1 Soro Fetal Bovino e Albumina Sérica Bovina	10
1.3.2 Linhagem celular canina DH82	12
1.3.3 Macrófago peritoneal murino (M ϕ)	12
1.4 Justificativa	14
2 Objetivos	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 Material e Métodos	17
3.1 Isolado de <i>Trypanosoma caninum</i>	17
3.2 Linhagem celular de macrófago-like canino (DH82)	17
3.3 Curva de Crescimento de <i>T. caninum</i>	18
3.3.1 Meio axênico.....	18
3.3.2 Cocultivo com linhagem celular DH82	19
3.4 Quantificação das formas evolutivas de <i>T. caninum</i>	19
3.5 Microscopia eletrônica de Transmissão e Varredura.....	19

3.6 Análise ultraestrutural de <i>T. caninum</i> em meio axênico e em cocultivo com a linhagem celular canina	21
3.7 Interação entre <i>T. caninum</i> -célula.....	21
3.7.1 Interação entre <i>T. caninum</i> e linhagem celular DH82.....	22
3.7.2 Interação entre <i>T. caninum</i> e células primárias de Macrófago Peritoneal	24
3.8 Análises das taxas de adesão e infecção	26
3.9 Análise estatística.....	26
4 Resultados	28
4.3 Análise ultraestrutural de <i>T. caninum</i>	31
4.4 Estudo da interação <i>T. caninum</i> - célula.....	34
4.4.1 Interação <i>T. caninum</i> – linhagem celular DH82 (TC-DH82).....	34
4.4.2 Análise das taxas de infecção e adesão da linhagem DH82 e TC	68
4.4.3 <i>T. caninum</i> - M ϕ (TC- M ϕ).....	68
4.4.5 Análise das taxas de infecção e adesão entre <i>T. caninum</i> e Macrófago Peritoneal	107
4.6 Análise estatística.....	108
5. Discussão	110
6 Conclusões.....	121
7 Referências	122
8 Anexos.....	133

Índice de Figuras

Figura 1: Representação das formas evolutivas presentes no gênero <i>Trypanosoma</i> . Modificado de D'Ávila Levy et al. 2015.....	3
Figura 2: Representação tridimensional das ultraestruturas presentes nas formas evolutivas. A: epimastigota; B: amastigota; C; tripomastigota;	5
Figura 3: Distribuição geográfica dos isolados de <i>T. caninum</i> descritos. Total de 62 casos distribuídos pelos seis estados: Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Mato Grosso (MT), Piauí (PI) e em Goiás (GO).	7
Figura 4: Formas evolutivas de <i>T. caninum</i> obtidas de meio axênico (NNN e Schneider). Coloração por Giemsa tamponada. A: epimastigota aflagelar; B: epimastigota flagelar; C: esferomastigota; D: tripomastigota;	8
Figura 5: Micrografia eletrônica de transmissão das ultraestruturas de <i>T. caninum</i> , em cocultivo com a linhagem celular DH82. A: Corpo do parasito e detalhe do cinetoplasto (C); B: evidências de corpúsculo lipídico (CL), núcleo (N); C: detalhe de microtúbulos subpeliculares (MS); D: Mitocôndria (M) ao longo do corpo do parasito, detalhe da bolsa flagelar (BF) e flagelo (F);	32
Figura 6: Micrografia eletrônica das ultraestruturas de <i>T. caninum</i> em meio axênico com predomínio de formas epimastigotas aflagelares. A: parasitos aflagelares; B: detalhe do cinetoplasto (C), corpúsculo lipídico (CL), núcleo (N); C: perfil da bolsa flagelar (BF); D: parasito com cinetoplasto ao lado do núcleo, mitocôndria (M) e microtúbulos subpeliculares (MS); E: detalhe do núcleo (N), bolsa flagelar (BF) contendo o flagelo (F), perfil do retículo endoplasmático (RE); F: detalhe do perfil do retículo endoplasmático (RE) distribuído ao longo do corpo do parasito.	33
Figura 7: Interação entre <i>T. caninum</i> e linhagem DH82, no tempo de 15 minutos na condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: parasito livre e adesão de epimastigota aflagelar (EA) pela porção anterior do.....	35
Figura 8 : Interação entre <i>T. caninum</i> e linhagem celular DH82 no tempo de 15 minutos na condição com meio suplementado com BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A e B: epimastigotas aflagelar aderidas a célula (seta); C: célula com inúmeros vacúolos (seta); D: amastigotas interiorizadas (setas);	36

Figura 9: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82, no tempo de 15 minutos na condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: adesão de *T. caninum* e parasito em divisão (setas); B, C: adesão de epimastigota aflagelar (EA) (seta); D: parasito em divisão e em mudança de forma (setas); 37

Figura 10: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82, no tempo de 15 minutos na condição com meio suplementado com BSA por MEV. A e C: adesão pela porção anterior do parasito (setas); B: adesão por todo o corpo do parasito (seta); D: amastigota em interação com os prolongamentos da célula (*). 38

Figura 11 : Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82 no tempo de 30 minutos na condição com meio suplementado SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. Amastigotas interiorizadas (setas); 39

Figura 12: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82, no tempo de 30 minutos na condição com BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. Amastigotas interiorizadas (*), em interação com a célula (seta) e livres (seta dupla);. 40

Figura 13: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82 no tempo de 30 minutos na condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: parasitos em mudança de formas e interagindo com a célula; B: adesão do parasito pela porção anterior do seu corpo; C e D: Detalhe do prolongamento da célula em contato com o parasito (seta); 41

Figura 14: Interação *T. caninum* e linhagem celular DH82 no tempo de 30 minutos na condição com meio suplementado com BSA por MEV entre. A: amastigota em interação com a célula (seta); B: aglomerado de amastigotas na célula; C e D: detalhe dos aglomerados de amastigotas; 42

Figura 15: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82 no tempo de 45 minutos em condição com meio suplementado SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: epimastigota aflagelar (EA) aderidos à célula (*), amastigota interiorizada e livre (seta); B: adesão de EA (*) e divisão parasitária (seta); C: interação entre amastigotas e a célula (seta); D: parasito em divisão (seta); 43

Figura 16: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82, no tempo de 45 minutos na condição com meio suplementado BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: interiorização (*) e interação com a forma amastigota (seta); B e C: interação entre amastigota com a célula; D: epimastigota aflagelar aderido (seta) e parasito sugestivo de mudança de forma (*) e EA livre (seta dupla); E: amastigota

interiorizada (*) e em interação com célula e amastigota ovóide sugestivo de mudança de forma; F: amastigotas livres; 44

Figura 17: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82, no tempo de 45 minutos na condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: amastigota em mudança para a forma epimastigota aflagelar (EA); B: adesão entre a forma EA com a célula; 45

Figura 18: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82, no tempo de 45 minutos na condição com meio suplementado com BSA, por MEV. A: parasito na forma amastigota em mudança para a forma epimastigota; B: amastigota na forma ovoide (*); C: amastigota em contato com célula rompida; D: detalhe da amastigota (*); 45

Figura 19: Interação entre *T. caninum* e a linhagem celular DH82 no tempo de 45 minutos por MET. A: interação de amastigota com a célula; B: detalhe da interação entre amastigota (*) e célula (#); C e D: amastigotas livres; 46

Figura 20: Interação entre *T. caninum* e a linhagem DH82 no tempo de 2 horas na condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A, B e D: Epimastigota aflagelar (EA) aderidos (*) e livres (seta), C: Forma EA aderida (*) à célula com todo o corpo; 47

Figura 21: Interação entre *T. caninum* com a linhagem DH82 no tempo de 2 horas na condição com meio suplementado com BSA, por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: amastigota (*) e epimastigota aflagelar (EA) (seta) interiorizado; B e D: adesão de EA à célula (setas); C: adesão de EA à célula e amastigota interiorizadas; E e G: amastigotas interiorizadas e em interação com a célula; F: EA livre e amastigota interiorizada; G: interação entre amastigotas e célula; 48

Figura 22: Interação entre *T. caninum* e a linhagem celular DH82 no tempo de 2 horas na condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: interação de amastigota na forma ovoide (*); B: adesão do parasito na célula. 49

Figura 23: Interação no tempo de 2 horas na condição com BSA pela técnica de MEV. A: adesão do parasito; B: mudança de forma do parasito da forma amastigota para epimastigota aflagelar; C: célula com amastigota interagindo com a membrana da célula; D: detalhe da amastigota em contato com a célula; 49

Figura 24: Interação entre *T. caninum* e linhagem DH82 no tempo de 6 horas na condição com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: amastigota interiorizada; B: adesão de epimastigota aflagelar (EA); C: divisão de amastigota no

interior do vacúolo parasitóforo; D: adesão de EA (seta) e interação (#), interiorização de amastigotas (*) e amastigotas livres (seta dupla); 51

Figura 25: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82 no tempo de 6 horas na condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: parasito na forma aflagelar aderido pela parte anterior na célula (seta); B: parasito da forma amastigota em mudança para a forma epimastigota; 52

Figura 26: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82, no tempo de 6 horas na condição com meio suplementado BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: epimastigota aflagelar (EA) livre (seta) e amastigota interiorizada (*); B: adesão de EA; C: interiorização de amastigotas em vacúolos (*) e adesão de EA (seta) D: parasitos livres (seta) e interiorizados (*); 52

Figura 27: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82 no tempo de 6 horas na condição com meio suplementado com BSA por MEV. A e B: adesão do parasito na forma epimastigota aflagelar (seta); C: aglomerados de amastigota; D: detalhe da amastigota em interação com a célula; 53

Figura 28: Interação entre *T. caninum* e linhagem DH82 no tempo de 6 horas na condição com meio suplementado com SFB por MET. A: amastigota em decomposição (*); B: amastigota interiorizada (*); C: interação entre amastigota (*) e células (#); D: detalhe da interação entre amastigota (*) e duas células (#); 54

Figura 29: Interação entre *T. caninum* e linhagem DH82, no tempo de 6 horas na condição com meio suplementado com BSA por MET. A, B e C: amastigotas livres; D: amastigota (*) interiorizada na célula (#); 55

Figura 30: Interação entre *T. caninum* e a linhagem celular DH82 no tempo de 24 horas na condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: amastigota interiorizada (seta); B: Divisão de amastigota no interior do vacúolo parasitóforo (seta); C e E: várias amastigotas interiorizadas (setas); D: interação de amastigota com a célula (seta); F: divisão do parasito fora da célula (seta); 57

Figura 31: Interação entre *T. caninum* e a linhagem celular DH82, no tempo de 24 horas na condição com meio suplementado com BSA por de MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: várias amastigotas interagindo com a célula (seta) e amastigota interiorizada (*); B: amastigotas interiorizadas; C: interiorização (*) e interação (seta) de amastigotas; D-F: interação de amastigotas; 58

Figura 32: Interação entre *T. caninum* e a linhagem celular DH82 no tempo de 24 horas na condição com meio suplementado SFB por MEV. A: adesão do parasito na forma epimastigota aflagelar (seta); B: forma amastigota ao lado da célula (*); C e D: amastigotas livres (seta) e (*); 59

Figura 33: Interação entre *T. caninum* e a linhagem celular DH82 no tempo de 24 horas na condição com meio suplementado com BSA por MEV. A: adesão do parasito na forma epimastigota aflagelar (EA); B e C: parasitos em mudança das formas amastigotas para EA (seta); D: detalhe do parasito mudando a forma amastigota para EA; E: adesão de EA; F, G e H: aglomerados de amastigotas; 60

Figura 34: Interação entre *T. caninum* e a linhagem celular DH82 no tempo de 24 horas na condição com meio suplementado com SFB por MET. A: amastigota livre; B: célula em degeneração com muitos vacúolos; C: parasito livre (*) ao lado da célula (#); D: detalhe do parasito livre próximo a célula; 61

Figura 35: Interação entre *T. caninum* e a linhagem celular DH82 no tempo de 24 horas na condição com meio suplementado com BSA por MET. A: parasitos livres; B: amastigota interiorizada evidenciando o cinetoplasto (C) e o flagelo(FL); C: detalhe da amastigota interiorizada, cinetoplasto (C), flagelo (FL) e mitocôndria (M); D: célula, com inúmeros vacúolos vazios em degeneração; E: célula com vários vacúolos e com amastigota interiorizada; F: detalhe da amastigota interiorizada; 62

Figura 36: Interação entre *T. caninum* e linhagem DH82, no tempo de 48 horas na condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A e C: amastigotas interiorizadas (seta) e livre (seta dupla); B e D: amastigotas em interação (*) e livres (seta dupla); E e F: aglomerados de amastigotas próximo à célula (seta) e amastigotas em interação com fragmentos da célula (*); 64

Figura 37: Interação entre *T. caninum* e linhagem DH82, no tempo de 48 horas na condição com meio suplementado com BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: amastigota (seta) e epimastigota aflagelar (EA) (seta dupla) livres; B e C: interação (seta) e interiorização de amastigotas (*); D: interação (seta) e interiorização de amastigota com a célula (*) e EA (seta dupla) próximo a célula; E: detalhe da interação entre amastigota e célula; F: amastigotas em interação com a célula (*), em mudança da forma amastigota para EA(#) e formas EA livres e em divisão (seta); 65

Figura 38: Interação entre *T. caninum* e linhagem DH82 no tempo de 48 horas na condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: amastigota interagindo com a célula e parasito em mudança de forma (setas); B: interação entre amastigota e célula; C:

parasito em mudança de forma evolutiva (seta); D: detalhe de aglomerados de amastigotas; 66

Figura 39: Interação entre *T. caninum* e linhagem DH82 no tempo de 48 horas na condição com meio suplementado com BSA por MEV. A e B: interação de amastigota com a célula; C: parasito aderido; D e E: detalhe da amastigota; F: amastigota e epimastigota aflagelar (seta) em interação com a célula; G e H: detalhe do aglomerado de amastigota;..... 67

Figura 40: Interação entre *T. caninum* e macrófago peritoneal (M ϕ), no tempo de 15 minutos em condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: amastigotas em interação com a célula (seta dupla) e interiorizadas na célula (seta); B: adesão de epimastigota aflagelar (EA) (*) e amastigota livre (seta); C: interação de amastigotas com a célula; D: interação de amastigota com a célula (seta dupla) e parasito sugerindo mudança de forma de amastigota para EA (seta); 70

Figura 41: Interação entre *T. caninum* e M ϕ , no tempo de 15 minutos em condição com meio suplementado com BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: EA aderido à célula (seta dupla) e amastigotas livres (seta); B: adesão de EA na célula pelo corpo, porção anterior e posterior do parasito (seta dupla); C: interação de amastigota com a célula e livre; D: amastigotas em interação com a célula (seta) e interiorizada (*), parasito sugestivo de mudança de forma (seta dupla); 71

Figura 42: Interação entre *T. caninum* e M ϕ no tempo de 15 minutos em condição com meio suplementado com SFB por MEV. A – C: adesão do parasito na forma EA; D: detalhe da adesão da forma EA sem projeção celular, sugerindo que o parasito faz adesão de forma ativa; 72

Figura 43: Interação entre *T. caninum* e M ϕ no tempo de 15 minutos em condição com meio suplementado com BSA por MEV. A e B: adesão da forma EA no M ϕ ; C: adesão do parasito; D: adesão do parasito na célula (seta) e amastigota em processo de mudança de forma (*);..... 73

Figura 44: Interação entre *T. caninum* e M ϕ , no tempo de 30 minutos na condição em condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: amastigotas interiorizadas na célula; B: amastigota internalizada (*) e fora da célula e parasitos em processo de mudança de forma; C: interação de amastigota com a célula (#) amastigotas internalizadas e em volta da célula amastigotas sugerindo

processo de evasão da célula (seta); D: célula alongada com interação de amastigotas (#) e aglomerados de amastigotas (seta); 74

Figura 45 : Interação entre *T. caninum* e M ϕ , no tempo de 30 minutos em condição com meio suplementado com BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: interiorização de amastigota; B: interação de amastigota com a célula; C: adesão de EA (seta), interiorização de amastigota (*) e amastigotas livres (seta dupla); D: amastigotas internalizadas (*), em aglomeração próximo à célula (seta) e em mudança de forma (seta dupla); E e F: adesão de EA, interação de amastigotas com a célula (seta) e amastigotas livres e em mudança de forma (seta dupla); 75

Figura 46: Interação entre *T. caninum* e M ϕ no tempo de 30 minutos em condição com meio suplementado com BSA por MEV. A e B: adesão do parasito na forma epimastigota aflagelar; C: adesão da forma EA e interação com amastigotas (seta); D: detalhe de amastigotas; 76

Figura 47: Interação entre *T. caninum* e M ϕ no tempo de 30 minutos em condição com meio suplementado com SFB por MEV. Adesão entre macrófago e forma epimastigota aflagelar por diferentes partes do corpo; 76

Figura 48: Interação entre *T. caninum* e M ϕ , no tempo de 45 minutos em condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: interação entre M ϕ e amastigotas (*) e amastigotas livres em forma ovoide, com forma mais próxima da forma EA (seta); B: amastigotas interiorizadas em vacúolos apertados; C: célula vacuolizada com interação com amastigota (#) e amastigotas livres (seta); D: amastigotas interagindo com prolongamentos da célula; 78

Figura 49: Interação entre *T. caninum* e M ϕ , no tempo de 45 minutos em condição com meio suplementado com BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: interação entre amastigota e célula; B: célula vacuolizada com amastigota interiorizada (*) em interação com amastigota ovoide (seta) e parasito na forma EA aderido à célula (seta dupla); C: célula desconstruída, interagindo com amastigota; D: interação de amastigota com a célula (seta dupla) e aglomerados de amastigotas livres; 79

Figura 50: Interação entre *T. caninum* e M ϕ no tempo de 45 minutos em condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: adesão de epimastigota aflagelar (EA) à célula; B: EA aderido na célula (seta dupla), amastigota em interação com a célula (seta) e depressão arredondada sugestiva da saída de amastigotas(*); C: parasito em mudança de forma e depressão arredondada sugestiva da saída de amastigota (*) D: célula livres (*) e interação com amastigota (seta); 80

Figura 51: Interação entre *T. caninum* e M ϕ no tempo de 45 minutos em condição com meio suplementado com BSA por MEV. A e B: adesão de EA na célula por todo o corpo; C: interação entre amastigota e célula (*); D: adesão entre EA pela parte posterior do corpo (seta) e interação com amastigota (*) com a célula;..... 81

Figura 52: Interação entre *T. caninum* e M ϕ no tempo de 45 minutos em condição com meio suplementado com SFB por MET. A: parasito interiorizado na célula; B: detalhe do parasito em vacúolo estreito (seta); C: Parasito endocitado na forma amastigota em estado de degeneração; D: adesão de epimastigota aflagelar (EA) com detalhe da endocitose com prolongamento citoplasmático; E: interação de amastigota; F: interação de dois parasitos durante processo de endocitose; G: interação de duas amastigotas com a célula; H: detalhe da amastigota em interação com a célula, evidenciando a estrutura da bolsa flagelar contendo flagelo; I: formação do prolongamento da célula em torno do parasito; J: detalhe da projeção realizada pela célula em torno do parasito no processo de endocitose; K: interação de amastigota e endocitose; L: detalhe da interação da amastigota com M ϕ ;..... 83

Figura 53: Interação entre *T. caninum* e M ϕ no tempo de 45 minutos em condição com o meio suplementado com BSA por MET. A: parasito aderido e dois endocitados na célula (*); B: adesão (detalhe); C: parasito aderido em destaque da seta pode-se visualizar a bolsa flagelar vazia; D: forma EA endocitada;..... 84

Figura 54: Interação entre *T. caninum* e M ϕ , no tempo de 2 horas em condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: célula com citoplasma fragmentado com amastigota interiorizada (seta), forma epimastigota aflagelar (EA) aderida e livre (seta dupla) B: amastigota interiorizados em células arredondadas; C: Forma EA livre (seta dupla) e célula com bastante amastigotas interiorizadas (seta); D: M ϕ alongado com inúmeras amastigotas interiorizadas nas células;..... 85

Figura 55: Interação entre *T. caninum* e M ϕ , no tempo de 2 horas em condição com meio suplementado com BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: célula vacuolizada com amastigotas interiorizadas (*) e em interação com amastigotas (seta); B : célula com citoplasma fragmento com interação de amastigotas (*) e aglomerados de amastigota (seta); C: interação entre forma amastigota e célula (seta dupla) e amastigotas livres (seta); D: interiorização de amastigotas; E e F: célula desconstruída com interação de amastigota (seta), amastigotas interiorizadas (*) e mais de uma amastigota no mesmo vacúolo indicando divisão de amastigotas (#);..... 86

Figura 56: Interação entre *T. caninum* e M ϕ no tempo de 2 horas em condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: adesão do parasito na célula; B: adesão de epimastigota aflagelar (EA) com a célula e transição de forma amastigota para EA; C: EA aderidas pelo corpo na célula; D: amastigota em interação com a célula e EA aderidas (setas);..... 87

Figura 57: Interação entre *T. caninum* e M ϕ no tempo de 2 horas em condição com meio suplementado com BSA por MEV. A e B: adesão de epimastigota aflagelar na célula; C: destaque da amastigota em interação com M ϕ e da divisão de EA; D-H: adesão em detalhes da forma EA com prolongamentos da célula; 88

Figura 58: Interação entre *T. caninum*, no tempo de 6 horas em condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: amastigota interiorizada (*), interagindo com a célula (seta) e livre (seta dupla); B: Formas EAs livres (seta), amastigotas no mesmo vacúolo sugerindo uma divisão de amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo (#) e amastigota interiorizada (*); C: célula espraçadas com prolongamentos em interação com amastigotas (seta) e amastigota interiorizadas; D: amastigota livre e interagindo com a célula (seta), amastigotas interiorizadas em vacúolos individuais (*) ou compartilhados (#); E: célula desconstruída com citoplasma repletos de amastigotas se destacando do núcleo; F: M ϕ contendo amastigotas interiorizadas (*), célula desconstruída com citoplasma separando-se do núcleo com inúmeras amastigotas (seta) e EA livre (seta dupla);..... 90

Figura 59: Interação entre *T. caninum* e M ϕ , no tempo de 6 horas em condição com meio suplementado com BSA pela técnica de MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: célula em interação com amastigota (seta dupla) e amastigota livre (seta); B: células com citoplasma fragmentado com interação de amastigota (seta dupla), mudança de forma (*) e amastigotas livres (seta); C e D: célula com várias amastigotas interiorizadas em vacúolos apertados (*) e amastigota em um vacúolo maior (#), mudança da forma de amastigota para EA (seta dupla) e amastigotas livres (seta); E e F: célula destruída com amastigotas livres e aglomeradas (seta) e interiorização de amastigota (*); 91

Figura 60: Interação entre *T. caninum* e M ϕ no tempo de 6 horas em condição com meio suplementado com SFB por MEV. A, B e C: aglomerado de parasitos com adesão da forma (EA) e amastigotas ovoides; D: mudança de forma do parasito, de amastigota para EA; E e F: aglomerados de amastigota e EA; G-H: formas amastigotas em diferentes formatos, sugerindo mudança de forma evolutiva;..... 92

Figura 61: Interação entre *T. caninum* e M ϕ no tempo de 6 horas em condição com meio suplementado com BSA por MEV. A: adesão de epimastigota aflagelar (EA) na célula; B: detalhes da adesão de EA; C e D: projeções celulares da célula primária nos EAs; E: amastigota mudando de forma para EA; F: ruptura da célula com amastigota em destaque; G: detalhe da amastigota em interação com a célula rompida; H e I: interação de amastigota com suporte da projeção celular; J: em detalhe, protuberância do interior da célula sugerindo amastigotas por baixo da membrana do M ϕ ; 93

Figura 62: Interação entre M ϕ e *T. caninum* no tempo de 6 horas em condição com meio suplementado com SFB por MET. A: amastigota em degeneração(*); B: adesão do parasito de forma direta(*); C: adesão do parasito(*) com prolongamento da célula (#) ancorando o parasito; D: adesão e presença de parasitos livres (*); 94

Figura 63: Interação entre M ϕ e *T. caninum* no tempo de 6 horas em condição com meio suplementado com BSA por MET. A: parasito na forma epimastigota (EA) aderido à célula e endocitado dentro de vacúolo (*); B: amastigota livre (seta) e em interação com a célula (seta dupla); C: amastigota em divisão (*) e amastigota interiorizada (#); D: amastigota interiorizada (*), interação com amastigota e adesão de EA com a célula; E e F: detalhe da projeção da célula durante interação de amastigota e adesão de EA (seta); 95

Figura 64: Interação entre *T. caninum* e M ϕ , no tempo de 24 horas em condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: amastigotas interiorizadas; B: amastigotas e epimastigotas aflagelares (EA), livres (setas), célula com amastigotas interiorizadas (*); C: célula com vacúolos vazios e com vacúolo contendo amastigota; D: célula com duas amastigotas dentro do mesmo vacúolo parasitóforo (#), parasitos sugerindo mudança de forma amastigota para EA (seta) sugere a evasão de parasitos da célula; E: inúmeras amastigotas interiorizadas algumas no mesmo vacúolo parasitóforo (#) e amastigotas livres (setas); F: na célula amastigotas interiorizadas (*) e célula com núcleo descontinuado e citoplasma fragmentado com evasão de amastigotas (seta); 97

Figura 65: Interação entre *T. caninum* e M ϕ , no tempo de 24 horas em condição com meio suplementado com BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: Forma epimastigota aflagelar (EA) livre (seta) e aderida à célula (seta dupla); B e C: interação entre amastigota e célula (seta dupla) e mudança de forma de amastigota para EA (seta); D, E e F: adesão de EA (seta), interação de amastigotas com a célula (seta dupla) e interiorização de amastigota (*); 98

Figura 66: Interação entre *T. caninum* e M ϕ no tempo de 24 horas em condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: divisão de parasito na forma epimastigota aflagelar (EA); B e C: amastigotas interagindo com a célula (seta); D: detalhe do prolongamento da célula projetada na amastigota (seta); 99

Figura 67: Interação entre *T. caninum* e M ϕ no tempo de 24 horas em condição com meio suplementado com BSA por MEV. A e B: Formas epimastigotas aflagelares (EA) aderidas às células; C: aglomerado de parasitos na forma EA e amastigotas; D e E: adesão de vários parasitos nas células; F: projeção celular em contato com o parasito; 100

Figura 68: Interação entre M ϕ e *T. caninum* no tempo de 24 horas em condição meio suplementado com SFB por MET. A: parasitos endocitados; B: detalhe de parasitos endocitados; 101

Figura 69: Interação entre M ϕ e *T. caninum* no tempo de 24 horas em condição com meio suplementado com BSA por MET. A: amastigotas endocitadas; B: detalhe dos parasitos interiorizados; C: detalhe parasito interagindo com a célula, sugestivo de transição de amastigota para EA; D: parasito aderido na célula; 101

Figura 70: Interação entre *T. caninum* e M ϕ , no tempo de 48 horas em condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: interação com a célula (seta) e interiorização de amastigotas (*) na célula; B: amastigotas interiorizadas em célula com citoplasma fragmentado; C: amastigotas livres (seta dupla), interiorizada (*) e em interação com a célula (setas); D: células em interação com amastigota (seta dupla) e amastigotas livres (seta); E e F: célula com citoplasma rompido com liberação de amastigotas; 103

Figura 71: Interação entre *T. caninum* e M ϕ , no tempo de 48 horas em condição com meio suplementado com BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: interação com a célula (seta) e interiorização (*) de amastigotas na célula; B: amastigotas interiorizadas em célula com citoplasma irregular; C e D: amastigotas livres e em interação com a célula; E: célula com citoplasma vacuolizado e amastigotas evadindo (seta); F: célula vacuolizada com liberação de amastigotas; 104

Figura 72: Interação entre *T. caninum* e M ϕ no tempo de 48 horas na condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: aglomerado de parasitos e forma epimastigota aflagelar (EA) em adesão com a célula; B: interação da célula com amastigota; C: EA aderido à célula; D: EA aderida à célula sob projeções do macrófago, amastigota interagindo com a célula sugerindo mudança de forma; E: EA recoberta por

projeção da célula; F e G: amastigota em mudança de forma para EA; H: amastigota irregular sugerindo mudança de forma; I e J: detalhe da interação entre amastigotas; 105

Figura 73: Interação entre *T. caninum* e M ϕ , no tempo de 48 horas em condição com meio suplementado com BSA por MEV. A: interação de amastigota; B: parasito em mudança de forma; C e D: parasito na forma amastigota interagindo com a célula, EA aderidos à célula e divisão de parasito; E: amastigota interagido com a célula; F: parasitos aderidos em célula com estruturas arredondadas; 106

Figura 74: esquema da infecção de *T. caninum* em células macrofágicas. As formas epimastigotas aflagelares aderem à célula seja por prolongamentos realizados pelo macrófago, ou de forma ativa, conseguem entrar na célula e no meio intracelular ficam em vacúolos parasitóforos apertados. Dentro desses vacúolos ocorre a mudança da forma epimastigota aflagelar para amastigota e essas amastigotas se multiplicam nesses vacúolos. Logo após, as amastigotas rompem a célula e no meio extracelular se diferenciam em epimastigotas aflagelares ou interagem com a célula novamente em um novo processo de infecção. Todo o processo ocorre em 15 minutos. Ao longo do tempo, o vacúolo se apresenta maior e várias amastigotas são visualizadas em seu interior (a partir do tempo de 6 horas). No tempo de 48 horas as células estão bastantes rompidas, no entanto, nas células íntegras ocorre uma maior adesão de epimastigota aflagelar dando início à um novo ciclo de infecção; 108

Índice de Tabelas

Tabela 1 : Quantificação das formas evolutivas de <i>T. caninum</i> em cada ponto da curva de crescimento em meio axênico.....	29
Tabela 2 : Quantificação das formas evolutivas de <i>T. caninum</i> na curva de crescimento em cocultivo com a linhagem celular DH82.....	30
Tabela 3: Resultado do Test-T na comparação entre os tipos celulares e tipos de suplementação do meio de cultura.....	109

Índice de Quadro

Quadro 1: Resumo das informações da interação entre *T. caninum* com a linhagem DH82 e com macrófago peritoneal murino nos tempos de 15, 30, 45 minutos e 2 horas.....110

Quadro 2: Resumo das informações da interação entre *T. caninum* com a linhagem DH82 e com macrófago peritoneal murino nos tempos de 6, 24 e 48 horas.....111

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Curva de crescimento do <i>T. caninum</i> em meio Schneider + 10% SFB a 27°C. O inóculo inicial foi de 1×10^6 parasitos/mL. Pico da fase log no 14º com $11,35 \times 10^6$ parasitos/mL.....	28
Gráfico 2 : Curva de crescimento de <i>T. caninum</i> em cocultivo com a célula DH82 a 37°C/ 5% de CO ₂ . O inóculo inicial foi de $0,8 \times 10^6$ parasitos/mL. O pico da fase log foi de 10º dia com $4,3 \times 10^6$ parasitos/mL.....	28
Gráfico 3: Quantificação das formas evolutivas de <i>T. caninum</i> em cada ponto da curva de crescimento em meio axênico. No início da curva de crescimento havia 92% de formas epimastigotas aflagelar (EA) e 8% de epimastigota flagelar (EF). A forma EF não foi mais visualizada a partir do 12º dia, apresentando 100% de formas EA.....	29
Gráfico 4 : Quantificação das formas evolutivas de <i>T. caninum</i> na curva de crescimento em cocultivo com a linhagem celular DH82. No início da curva de crescimento havia 92% de formas epimastigotas aflagelar (EA) e 8% de epimastigota flagelares (EF). A partir do décimo segundo dia apresentou a maior diversidade de formas evolutivas: EF, tripomastigota e esferomastigota.	30
Gráfico 5 : Taxa de adesão de <i>T. caninum</i> em interação com a linhagem DH82. A: condição com SFB; B: condição com BSA;.....	68
Gráfico 6 : Taxa de adesão de <i>T. caninum</i> em interação com a linhagem DH82. A: condição com SFB; B: condição com BSA;.....	68
Gráfico 7 : Taxa de adesão de <i>T. caninum</i> em interação com a linhagem DH82. A: condição com SFB; B: condição com BSA;.....	107
Gráfico 8 : Taxa de infecção da interação entre <i>T. caninum</i> e Mφ. A: interação realizada com meio de cultura suplementado com SFB; B: interação realizada com meio de cultura suplementado com BSA;	107

Lista de Siglas e Abreviatura

BSA	Albumina sérica bovina
COLTRYP	Coleção de <i>Trypanosoma</i> de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
EA	Epimastigota aflagelar
FAZ	zona de fixação do flagelo
Fig.	Figura
HCl	Ácido clorídrico
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
kDNA	Kinetoplast Deoxyribonucleic acid / DNA do cinetoplasto
LABTRIP	Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos
LaPClin	VigiLeish - Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses
LBE	Laboratório de Biologia Estrutural
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
M ϕ	Macrófago peritoneal
NK	Célula natural killer
M1	"M1 Macrophages"/ macrófagos M1
M2	"M2 Macrophages"/ macrófagos M2
NNN	Novy MacNeal Nicolle
pH	Potencial hidrogeniônico
PBS	(phosphate buffered saline) Tampão fosfato salino
rDNA	Ribosomal Deoxyribonucleic acid / DNA ribosomal
RPMI	Meio do Instituto Roswell Park Memorial
<i>T. caninum</i>	<i>Trypanosoma caninum</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
SFB	Soro Fetal Bovino

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Trypanosoma*

Os tripanosomatídeos incluem 18 gêneros sendo classificados como monogenéticos ou monoxênicos (parasitos que apresentam apenas um único hospedeiro em seu ciclo de vida, seja ele vertebrado, outro protozoário, planta ou invertebrado) e digenéticos ou heteroxênicos (parasitas que utilizam dois hospedeiros para completar o seu ciclo de vida parasitário, um artrópode e de um animal vertebrado ou uma planta). Apenas três gêneros são classificados como digenéticos (*Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum*). David Gruby, propôs o gênero *Trypanosoma* em 1843, quando observou protozoários parasitos com flagelo único, no sangue de uma rã, em Paris. Desde então tem-se proposto inúmeras descrições de espécies dentro deste gênero, contabilizando mais de 470 espécies nomeadas e distribuídas por todo o mundo (Andrade-Filho 2013; Molina 2016).

Os parasitos do gênero *Trypanosoma* são capazes de infectar um largo espectro de hospedeiros de todas as classes de vertebrados: peixes, anfíbios, répteis, aves, e mamíferos, e utiliza um hospedeiro invertebrado hematófago ou sanguessugas aquáticas para passar para outro vertebrado e assim se manter na natureza (Kaufer et al. 2017). A ampla dispersão das espécies pelos continentes, a expressiva variedades de taxa de hospedeiros envolvidos, o ciclo de transmissão, somadas com a divergência genética que apresentam apontam que esses flagelados teriam surgido juntos com os primeiros vertebrados da Terra há mais de 100 milhões de anos (Stevens et al. 2001; Hamilton et al. 2004, 2007; Viola et al. 2009; Molina 2016; Hamilton e Stevens 2017).

Mesmo após mais de um século da descrição do gênero *Trypanosoma*, ainda restam muitas dúvidas e mesmo curiosidades a respeito desses flagelados. Algumas espécies são mais estudadas, por apresentarem importância médica e veterinária, logo existe maior quantidade de informações desde a morfologia, ciclo biológico, patogenicidade, transmissão, aspectos moleculares e bioquímicos, entre outros (Vickerman 1994; Stuart et al. 2008; D'Ávila Levy et al. 2015). Outras espécies por esse motivo são pouco estudadas, como no caso da maioria das espécies do gênero *Trypanosoma* (Peirce e Neal

1974; Thekiso, et al. 2007; Austen et al. 2009; McInnes et al. 2010; Austen et al. 2011; Lizundia et al. 2011; Dyachenko et al. 2017).

1.1.1 Aspectos morfológicos e ultraestruturais

Desde estudos realizados por Hoare e Wallace (1966), em diferentes gêneros, como *Leshmania*, *Trypanosoma*, *Leptomonas*, dentre outros tem-se descoberto aspectos importantes da morfologia dos tripanosomatídeos. A diversidade morfológica desses parasitos caracteriza os diferentes estágios evolutivos das espécies diferindo entre e intra especificamente. As formas evolutivas são caracterizadas pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e a forma da célula (morfotipos) de acordo com o sistema clássico de taxonomia (Martins 2016).

No gênero *Trypanosoma* são descritas as seguintes formas evolutivas: epimastigotas, tripomastigotas, esferomastigotas e amastigotas além de outras formas em transição. As formas epimastigota e tripomastigota são classificadas principalmente pela posição do cinetoplasto e local de exteriorização do flagelo, as outras duas basicamente pela conformação celular. O flagelo se posiciona a partir do cinetoplasto, anterior ao núcleo (epimastigota) e posterior ao núcleo (tripomastigota) (D'Avila Levy et al. 2015, Martins 2016). A forma epimastigota é uma forma alongada mais larga e o flagelo é aderido ao corpo celular tornando-se livre na parte anterior. A forma tripomastigota é alongada, porém mais afilada e o flagelo fica aderido por todo corpo celular até estar livre na porção anterior do parasito, fazendo uma ondulação no flagelo aderido ao corpo do parasito. A forma amastigota é encontrada no interior das células de hospedeiros mamíferos infectados, onde se multiplicam. É arredondada e apresenta um flagelo bem reduzido dentro da bolsa flagelar. O núcleo redondo e extravagante e entre o núcleo e o flagelo em forma de bastão é localizado o cinetoplasto. A esferomastigota é uma forma mais comumente encontrada em culturas mais antigas do que na fase exponencial de crescimento do parasito. O parasito apresenta flagelo bem alongado e corpo celular mais esférico (Figura 1).

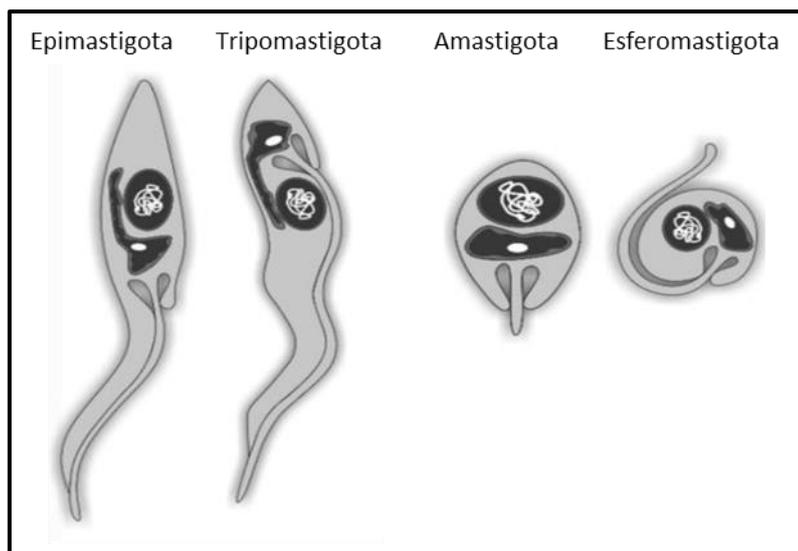


Figura 1: Representação das formas evolutivas presentes no gênero *Trypanosoma*. Modificado de D ´Avila Levy et al. 2015.

Em relação a características ultraestruturais, os tripanosomas possuem organelas bastante características que denotam importante contribuição para o desenvolvimento e manutenção do parasito: núcleo, mitocôndria, cinetoplasto, microtúbulos subpeliculares, acidocalcissomo, reservossomo, bolsa flagelar e flagelo (Bastin 1999; Miranda et al. 2000; Miranda et al. 2004; Do campo et al. 2005; De Souza 2009; Lopes 2016) (figura 2).

O cinetoplasto, estrutura que lhes asseguram a classificação na classe Kinetoplastea, é uma região de DNA condensado (kDNA), facilmente observada em microscopia de campo claro após coloração sua forma e organização estrutural variam de acordo com a fase evolutiva do parasito. É constituída por dois tipos de moléculas circulares, os maxicírculos e os minicírculos, que se apresentam concatenados, formando uma compacta rede, conforme observação por microscopia eletrônica e representam cerca de 20% do DNA (kDNA) total da célula. Os maxicírculos são minoritários (5%) e são formados por sequencias homogêneas, estando presentes de 20 a 50 cópias por rede e codificam os genes mitocondriais estruturais (De-La Cruz et al, 1984). Nas moléculas de minicírculos do kDNA, são encontradas duas regiões distintas: uma região denominada conservada que apresenta uma sequência nucleotídica de 120 a 200 pb compartilhada intraespecificamente entre todos os minicírculos do kDNA e outra região denominada variável apresenta uma heterogeneidade nas sequências e difere entre as diferentes classes de minicírculos da mesma rede.

A mitocôndria única altamente ramificada, disposta ao longo do corpo celular do parasito; juntamente com o cinetoplasto forma o complexo cinetoplasto-mitochondrial. É encarregado por quase toda a respiração celular do flagelado.

A presença dos microtúbulos subpeliculares em arranjos formam o citoesqueleto do parasito, ao longo do corpo que lhes conferem sustentação e forma estrutural;

Há a presença das inclusões lipídicas, os corpúsculos lipídicos, descritas como organelas associadas a reserva energética, são reservas de lipídeos que ficam à disposição do parasito para a sustentação energética da célula. Podendo estar relacionada a mudança das formas evolutivas;

Os glicossomos, são considerados os peroxissomos desses flagelados por apresentarem catalases, que atuam na degradação do peróxido de hidrogênio, estão envolvidos na glicólise parasitária;

O acidocalcissomo é apontado como o responsável pelo armazenamento de cálcio, magnésio, sódio, potássio, zinco ferro e compostos de fosfato. Porém a concentração de cada substância varia de espécies para espécie. Uma outra função dessa estrutura é de participar do controle do pH do parasito;

Os reservossomos, foram sugeridos como estruturas relacionadas aos lisossomos, muito apontadas como sendo estrutura pertencente a forma epimastigota. Muitas atividades podem ser executadas por tal organela, que tem como principal função o armazenamento de lipídeo;

A bolsa flagelar juntamente com o cistótomo são os únicos locais do corpo parasitário que não possuem os microtúbulos subpeliculares ao longo da sua formação. A bolsa flagelar é uma invaginação da membrana citoplasmática que abriga o flagelo e é a região onde ocorre a endocitose nutricional.

O flagelo é uma estrutura disposta por 9 pares (dupletos) de microtúbulos na periferia e de um par no centro (axonema). Ao lado do axonema, há uma estrutura canônica em forma de treliça que é constante em todo o comprimento do flagelo, desde a bolsa flagelar até o final do flagelo. Essa estrutura é chamada haste paraflagelar ou também chamada de paraxial. Está ligado no corpo celular por complexa rede de filamentos (zona de fixação do flagelo ou FAZ) subjacente

a ambos. Sempre entre o axonema e a FAZ a haste paraflagelar está presente. Várias funções são atribuídas a essa estrutura, mas tem como principais funções a mobilidade, e a função sensorial.

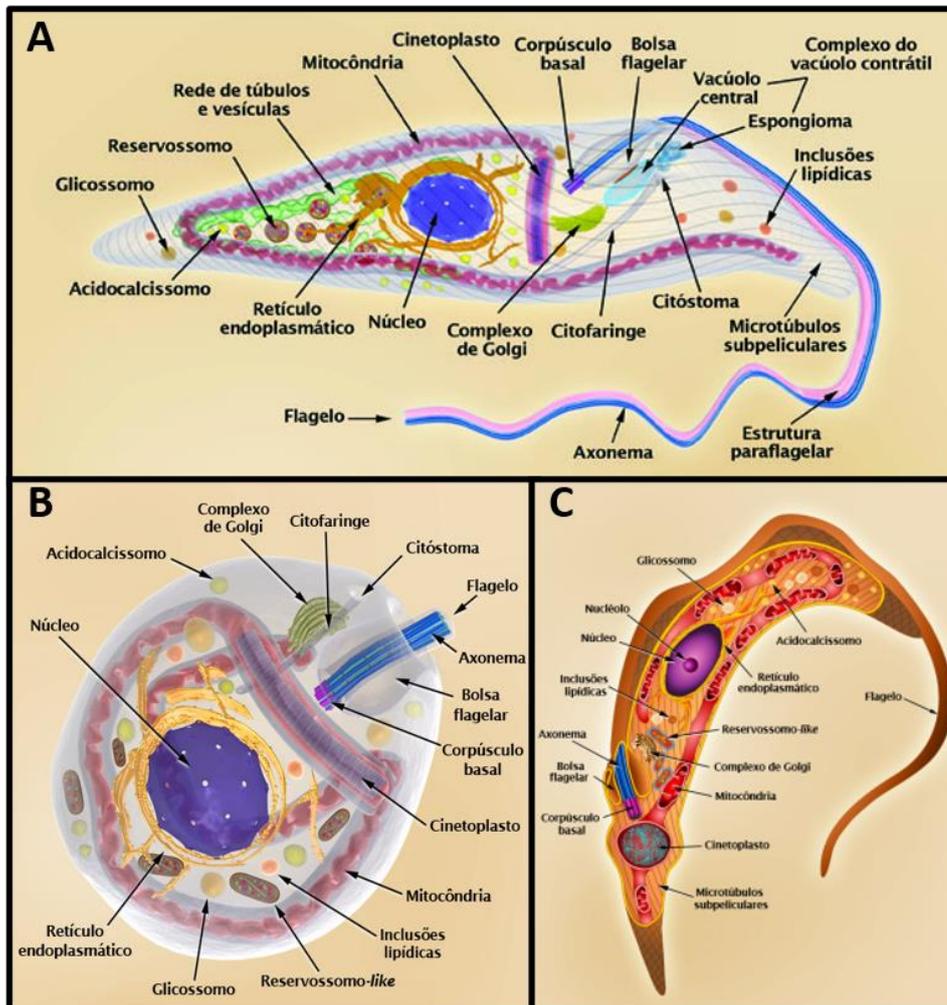


Figura 2: Representação tridimensional das ultraestruturas presentes nas formas evolutivas. A: epimastigota; B: amastigota; C: tripomastigota;
 Fonte: <https://www.emaze.com/@ACOQWCWI/chagas-diseasecopy2>
 (professora Jackellyne Geórgia Leite).

Com o avanço das pesquisas e da tecnologia, o sistema de taxonomia não depende mais exclusivamente da taxonomia clássica. As técnicas moleculares têm sido fundamentais na caracterização de várias espécies de *Trypanosoma*, como *Trypanosoma KG1*, *T. terrestres*, e outras tantas espécies que foram sendo descritas mais recentemente como *Trypanosoma wauwau*, *Trypanosoma janseni* e *Trypanosoma madeirae* (Thekiso et al. 2007; Acosta et al. 2013, Lima et al. 2015; Lopes et al. 2018; Barros et al. 2019). Com isso,

atualmente, as espécies pertencentes ao gênero *Trypanosoma*, têm sido organizadas e comparadas geneticamente e alocadas em pequenos grupos por proximidades filogenéticas, originando assim os clados. Parasitos do gênero *Trypanosoma* são de origem monofilética, ou seja, as espécies possuem um ancestral comum e estão organizadas em 11 clados. Dentre esses 11 clados, 3 são grandes clados: clado *T. cruzi*, clado de tripanosomas de animais aquáticos e clado *T. brucei*. Os demais 8 clados são: clado *T. theileire*, clado *T. lewisi*, clado *T. irwini*, clado *T. terrestres*, clado de tripanosomas de cobras-lagartos/marsupiais-roedores, clado de tripanosomas de marsupiais australianos, clado de tripanosomas de crocodilianos e o clado de tripanosomas de aves (Acosta et al. 2013; Lima et al. 2015; Lopes 2016).

1.2 *Trypanosoma caninum*

A pesquisa e monitoramento das leishmanioses visceral e tegumentar em áreas endêmicas são importantes para o acompanhamento das infecções simples e coinfeções de *Leishmania* spp. e demais tripanosomatídeos em cães domésticos (Madeira et al. 2009; Porfírio et al. 2018). Durante uma investigação de vigilância para Leishmaniose Visceral Canina, em 2003 *Trypanosoma caninum* foi isolado pela primeira vez em cultura axênica de pele íntegra de um cão do bairro de Campo Grande, Rio de Janeiro. Neste mesmo cão, também foram isoladas, de lesão cutânea, formas promastigotas caracterizadas como *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Madeira et al. 2009).

Após análises biológicas, morfológicas, moleculares e de bioquímicas (isoenzimas), *Trypanosoma caninum* foi descrito como uma nova espécie do gênero *Trypanosoma* em 2009 (Madeira et al. 2009; Barros et al. 2012). Até o momento, foram descritos 62 casos de infecção natural por *T. caninum* em cães, em infecções simples e coinfeções dispersos por seis estados brasileiros: Rio de Janeiro, São Paulo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e Piauí, em locais com ocorrência de leishmanioses (Figura 3 do mapa) (Pinto et al. 2010; Barros et al. 2012; Madeira et al. 2014; Oliveira et al. 2015). Todos os isolados de *T. caninum* foram caracterizados a partir da amplificação e sequenciamento nucleotídico da região parcial do gene 18S rDNA (Pinto et al. 2010; Barros et al. 2012; Oliveira et al. 2015). Adicionalmente, a fim de gerar mais informações a nível molecular, foram analisadas outras regiões do genoma de *T. caninum*, como 24S rDNA,

ITS1rDNA, Citocromo b, kDNA, revelando a alta similaridade genética entre os isolados de *T. caninum* descritos nos seis estados (Barros et al. 2015). De acordo com a análise filogenética da região parcial do gene 18S rDNA, *T. caninum* está inserido no clado de Tripanosomas de marsupiais Australianos, que inicialmente era composto por tripanosomas de marsupiais e ao longo do tempo foi incluído também tripanosomas de texugo, sendo o primeiro *Trypanosoma* de cão brasileiro do clado (Rodrigues 2019).



Figura 3: Distribuição geográfica dos isolados de *T. caninum* descritos. Total de 62 casos distribuídos pelos seis estados: Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Mato Grosso (MT), Piauí (PI) e em Goiás (GO).

T. caninum possui características intrigantes e com particularidades: até o momento foi isolado apenas da cultura de pele íntegra de cães e é mantido facilmente em meio ágar sangue Neal, Novy, Nicolle (NNN) e Schneider. Apresenta além das formas evolutivas descritas em espécies do gênero *Trypanosoma* (epimastigota, tripomastigota e esferomastigota), a forma epimastigota aflagelar em cultura axênica (Figura 4) (Barros et al. 2014). Na análise por microscopia eletrônica de transmissão da forma epimastigota aflagelar foi visualizada a bolsa flagelar vazia e cinetoplasto localizado ao lado do núcleo. De acordo com o estudo da cinética de crescimento da forma epimastigota aflagelar, os autores sugerem que o flagelo é originado

gradativamente, dando origem a forma epimastigota flagelada (Barros et al. 2014).

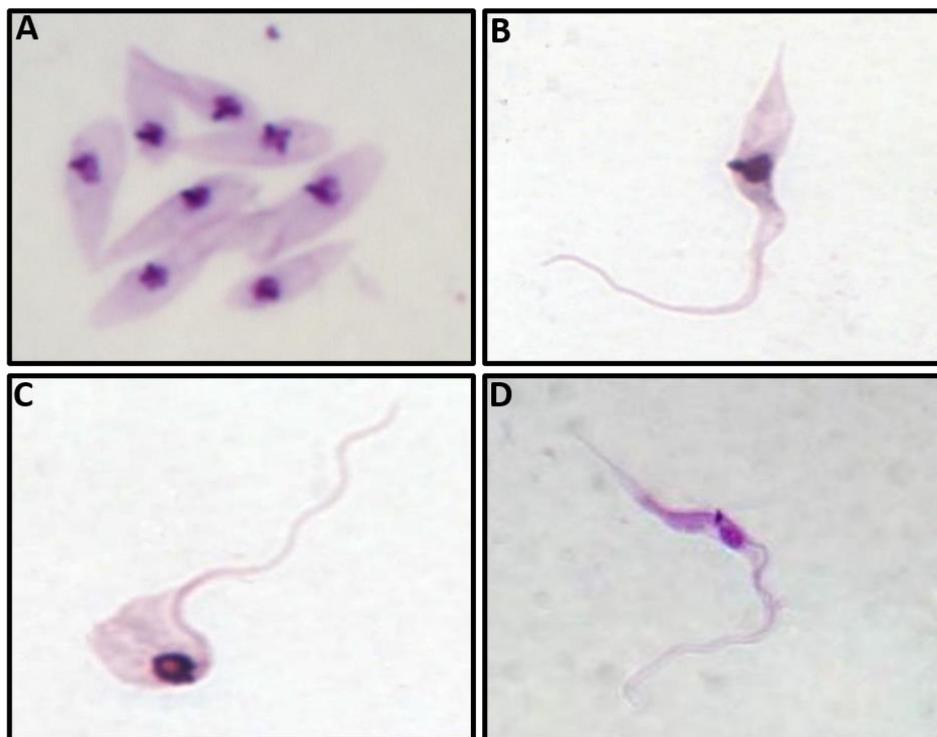


Figura 4: Formas evolutivas de *T. caninum* obtidas de meio axênico (NNN e Schneider). Coloração por Giemsa tamponada. A: epimastigota aflagelar; B: epimastigota flagelar; C: esferomastigota; D: tripomastigota; Escala de 10µm. Fonte: Barros, 2013.

Estudos apresentados ao longo desses anos sugerem não haver patogenicidade de *T. caninum* para os cães, visto que os animais em que foram isolados este parasito possuíam boas condições físicas. Além disso, a infecção por *T. caninum* resulta em baixa resposta imunológica do cão, de acordo com os títulos baixos encontrados a partir do diagnóstico sorológico (Alves et al. 2012; Barros et al. 2014).

Um outro fator intrigante é o fato de seu ciclo biológico ainda ser desconhecido, bem como o vetor responsável pela transmissão e como se insere no âmbito silvestre na infecção de outros hospedeiros mamíferos, além do cão doméstico. Até o momento não se conhece a forma evolutiva infectante desse parasito e até então não há relatos de que ele seja capaz de infectar e se diferenciar na forma amastigota, como, por exemplo, em infecções por *T. cruzi* (Hoare 1972; De Souza 2009).

Diferentes estudos já foram realizados a fim de testar a capacidade infectiva de *T. caninum*:

- Estudos para testar a infectividade de *T. caninum* em espécimes de triatomíneos das espécies *Rhodnius neglectus* e *Triatoma infestans* foram realizados, no entanto não foram detectadas formas de *T. caninum* em intestino, hemolinfa e glândula salivar destes insetos (Madeira et al. 2009).

- Foi realizada infecção experimental *in vitro* de *T. caninum* em macrófagos de camundongos murinos da espécie Swiss Webster. Neste experimento foram utilizadas formas tripomastigotas de *T. caninum*, que foram induzidas à metaciclogênese por meio de cultura Instituto Roswell Park Memorial (RPMI). Após 72 horas de interação, *T. caninum* não foi mais visualizado (Madeira et al. 2009).

- Também foi realizada infecção experimental *in vitro* com formas tripomastigotas induzidas por metaciclogênese de *T. caninum* com duas linhagens celulares caninas (MDCK-2, DH82) e uma linhagem de tecido embrionário de flebotomíneo (Lulo). No entanto, não foi constatada infecção de *T. caninum* nas três células (Fonseca-Oliveira et al. 2018).

- Foi realizado também um estudo experimental *in vivo* no qual utilizou-se formas tripomastigotas de *T. caninum*, induzidas por cocultivo da linhagem celular DH82 para inóculo em camundongos murinos da espécie Swiss Webster. Este inóculo foi realizado pelas vias intradérmicas e intraperitoneal e o diagnóstico da infecção experimental foi realizado por cultura e imprint de diferentes órgãos, por técnicas histopatológicas e pela técnica molecular. Apesar de terem sido observadas alterações histológicas, não foi identificado infecção pelo *T. caninum*. Por PCR conseguiu amplificar o material genético de *T. caninum* em pele, baço, fígado, coração e sangue.

1.3 Estudo de interação *Trypanosoma* x célula

Desde a descoberta do gênero *Trypanosoma*, que a comunidade científica tem trabalhado intensivamente para compreender como os parasitos desse gênero interagem com os artrópodes vetores e com as diversas espécies de mamíferos (Chagas1909; Hoare 1972; Galvão et al.2003). Estudos de interação parasita-célula são muito utilizados, principalmente para obter informações relacionadas às formas evolutivas encontradas no hospedeiro

vertebrado. Conhecer as estratégias selecionadas para infectar um hospedeiro é um passo importante para conhecer a natureza, as interações entre os seres vivos e enfim, o parasito. Fatores esses que podem variar de acordo com a célula e o parasito envolvidos, seja no tipo de receptores ligantes do parasito, proteína e moléculas expostas nas superfícies da célula sejam outros fatores que resultam no sucesso ou falha na infecção (Fessel 2006; De Souza et al. 2013, Barrias et al. 2019). Pela sua importância no contexto da saúde pública, *T. cruzi* e *Trypanosoma* spp. do grupo brucei são as mais bem estudadas do gênero, incluindo os estudos *in vitro* realizados na tentativa de se conhecer cada vez mais os mecanismos da interação parasito-hospedeiro (Thurston 1958; Ley et al. 1988; De Souza 2002; De Souza et al. 2010; Li e He 2017; Duque et al. 2020).

Desde a introdução do uso *in vitro* de células de fibras nervosas no início do século XX pelo pioneiro Harrison, o emprego de células primárias e de linhagens celulares são primordiais em estudos que delimitam a relação parasito- hospedeiro (Alves e Guimarães 2010). Inúmeras linhagens celulares foram estabelecidas para este propósito e incluem linhagens derivadas de diferentes tecidos (sangue, coração, rim, peritônio, pele, etc) de diferentes animais (homem, cão, roedores, artrópodes, etc) (Scherer et al.1953; Gauth e Smith 1968; Unkeless 1979; Bello et al. 2005), que podem ser obtidas comercialmente e empregadas com diferentes objetivos. Além da escolha da célula, é necessário um adequado suporte nutricional para que as células possam se manter estáveis e capazes de responder aos objetivos traçados durante cada pesquisa de acordo com condições pré determinadas. Esse suporte nutricional é realizado com o meio de cultura e sua suplementação com fatores de crescimento, como por exemplo soro fetal bovino (SFB) e albumina sérica bovina (BSA), que melhor se adequa as necessidades da célula em estudo (Alves e Guimarães 2010).

Os estudos experimentais *in vitro* apresentam vantagens, como ter o controle ambiental do experimento, obter uma uniformidade das amostras, além da ética por deixar de utilizar animais e são capazes de sugerir o que ocorre em condições naturais (*in vivo*) (Alves e Guimarães 2010).

1.3.1 Soro Fetal Bovino e Albumina Sérica Bovina

O Soro Fetal Bovino (SFB) foi introduzido na cultura de células no final dos anos 1950 para estimular o crescimento celular das culturas de células e de tecidos (Puck et al. 1958). É a suplementação proteica mais amplamente utilizada em meios de culturas de células, composto por nutrientes com alta concentração de hormônios, fatores de crescimento e de fixação, vitaminas, que são metabólicos necessários para os cultivos celulares (Alves e Guimarães 2010). Apesar da solidificação do uso do SFB ao longo do tempo, recentemente a literatura tem apresentado trabalhos que demonstram que a utilização dessa suplementação pode trazer menos vantagens e mais desvantagens científicas. Essas desvantagens estão relacionadas principalmente à consistência dos resultados, uma vez que são influenciados pela sazonalidade e região geográfica que originam cada lote da produção e por possuir composições desconhecidas que podem variar drasticamente. Tais características podem resultar em uma inconsistente expressão de nutrientes e sua atividade biológica pode levar a variabilidade no experimento resultando na falta de reprodutibilidade dos resultados. Além disso pode haver questões de biossegurança dos manipuladores, principalmente, em relação a endotoxinas, micoplasmas, príons ou contaminantes virais (Van der Valk et al. 2018; Baker 2016). A produção do SFB é uma grande questão ética devido ao alto índice de fetos bovinos nos quais é extraído sangue de forma incorreta, pela possibilidade de causar dor ao feto. As taxas de fetos mortos para a sua produção atingem a casa de milhões de fetos mortos anualmente (Van der Valk et al. 2018; Mellor et al. 2005; Baker 2016).

A albumina sérica bovina (BSA) é um aditivo de proteína comum, que ao ser comparada com a variabilidade nutricional de lote para lote, encontrada no SFB é considerada mais consistente em sua composição. As albuminas são um grupo de proteínas ácidas que ocorrem abundantemente em fluidos corporais de mamíferos. A albumina sérica é rica em aminoácidos, isenta de carboidratos e é a proteína mais abundante em organismos vertebrados (Zhou et al. 2020; Merlot et al. 2014). Ademais a BSA é uma proteína transportadora natural, podendo transportar pequenas moléculas como sais, ácido graxo e vitaminas e podem atuar na proteção a danos oxidativos nas células e regular outros componentes do meio, incluindo o ácido graxo (Zhou et al. 2020).

1.3.2 Linhagem celular canina DH82

A linhagem celular de macrófago like (DH82) é de origem hematopoiética de cão Golden Retriever, macho de 10 anos de idade diagnosticado com histiocitose maligna. As células progenitoras neoplásicas foram estabilizadas em 1985. Essa linhagem apresenta a morfologia de macrófago, com variação no tamanho e quantidades de núcleos e nucléolos, além de ser uma excelente célula fagocítica. É uma linhagem celular notavelmente heterogênea. Apresenta receptores de superfície Fc, importantes na interação parasito célula (Wellman et al. 1988). Já foi utilizada em diferentes estudos, desde estudos de bactérias (Michaels et al. 2016), de alergia (Herrmann et al. 2018), em estudos com vírus (Zheng et al. 2020). Em estudo com *T. cruzi*, Mendonça et al. 2017, realizaram pela primeira vez a interação com essa linhagem e demonstraram que ela é suscetível à infecção pelo *T. cruzi*, nela ocorre todo o ciclo intracelular, a invasão do parasito, presença de amastigotas intracelulares, replicação parasitária, transformação em tripomastigotas, além do prolongado período de infecção com macrófago de cão. Os autores reforçam a utilização dessa célula como modelo para investigar a interação hospedeiro-parasito *in vitro* e ela poderia contribuir em experimentos para identificar novos medicamentos para o tratamento da doença de Chagas.

1.3.3 Macrófago peritoneal murino (M ϕ)

A utilização do macrófago peritoneal de camundongos, tem-se dado desde o início do século XX, quando estudos conduzidos por um biólogo russo concedeu a compreensão da fagocitose (Dos Anjos Cassado 2017). A partir daí, os estudos deslancharam e a sua utilização como modelo experimental começou a ser consolidado (Cassado 2011; Dos Anjos Cassado 2017). Vários trabalhos foram realizados com utilização de M ϕ com diferentes abordagens, dentre elas trabalhos recentes de recrutamento de organelas durante interação com *T. cruzi* (Reignault et al. 2019), autofagia (Duque et al. 2020) e em trabalhos de interação com diferentes espécies do gênero *Trypanosoma* como, *Trypanosoma dionisii* (Liston e Baker 1978), *Trypanosoma brucei* (Stevens e Moulton 1978) e *Trypanosoma musculi* (Vincendeau et al. 1981).

Os macrófagos são considerados sentinelas imunológicas devido ao fato de estarem presentes em diferentes tecidos, participando da defesa inata

(Cassado 2011). A cavidade peritoneal se origina pelo folheto embrionário da mesoderme, mais especificamente pelo hipômero (células primitivas), que é uma das três divisões da mesoderme, juntamente com o epímero e o mesômero. O epímero dá forma a derme, musculatura estriada e esqueleto axial. O mesômero forma o aparelho urogenital, já o hipômero é responsável pela formação do sistema circulatório, esquelético apendicular, musculatura lisa e as três serosas (pericárdio, pleura e peritônio). O peritônio abriga boa parte dos órgãos, juntamente com uma diversidade de células do sistema imune como linfócitos T e B, célula natural killer (NK), granulócitos e os fagócitos (Moore et al. 2016).

Os macrófagos são monócitos da circulação sanguínea que migram para o tecido e se diferenciam. Esses macrófagos podem ser divididos em duas populações, sendo denominados de M1 e de M2 e dentre as suas funções destacam-se a fagocitose, apresentação de antígeno, resolução do processo inflamatório e reparo de tecido lesado (Cassado 2011; Dos Anjos Cassado 2017). Por serem células primárias, são semelhantes fisiologicamente às células do tecido vivo e como as linhagens celulares podem sofrer alterações genotípicas e fenotípicas e não podem determinar o que ocorre *in vivo*, as células primárias têm importante papel em estudos de pesquisas. No entanto, por mais próximo que esteja do real o cultivo *in vitro* ainda apresenta diferenças do tecido vivo, principalmente pelas mudanças nutricionais e hormonais (Alves e Guimarães 2010).

1.3.4 Cocultivo parasito – célula

Desde a primeira linhagem celular estabelecida pelo biólogo George Gey, foi um longo caminho até as culturas de células provarem ser indispensáveis para uma variedade de aplicações, desde a pesquisa à indústria (Ravi et al. 2015). Existem inúmeras células disponíveis originadas de diferentes espécies e diversas técnicas de cultivo, que variam da gota pendente à técnica 3D (Ravi et al. 2015). Dentre tantas técnicas, o cocultivo de células e parasitos tem se mostrado uma excelente estratégia para o isolamento e manutenção de parasitos que apresentam dificuldades em seu cultivo, como no caso do *Trypanosoma freitasi*, que até o cocultivo com a linhagem L292 não era possível a manutenção desta espécie em cultivo axênico. E a partir do cocultivo, foram possíveis o crescimento parasitário e a obtenção da forma tripomastigota

(Thomas e Deane 1990). A mesma abordagem foi realizada por Thekiso et al. 2007, que utilizaram as linhagens L292 e HEK 293T em cocultivo com o parasito KG1. E *Trypanosoma pestanai*, do mesmo clado filogenético do parasito KG1, que em cocultivo com a célula ISE6 foi possível observar as formas tripomastigotas (Dyachenko et al. 2017). A utilização da célula BHK se mostrou adequada para o isolamento e manutenção a longo prazo do parasita *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* (Lee et al. 2010). Para o parasito *Toxoplasma gondii*, essa técnica celular se tornou uma importante alternativa na obtenção de taquizoítas, o que diminuiria o uso de utilização de camundongos para sua manutenção (Alves e Guimarães 2010; Szabo e Finney 2017)

1.4 Justificativa

O primeiro encontro de *T. caninum* infectando um cão doméstico no município do Rio de Janeiro, em 2003, parecia que seria um achado ocasional, sem importância epidemiológica (Madeira et al. 2009). No entanto, outros isolados similares à espécie original, foram sendo obtidos de outros cães no município do Rio de Janeiro e em diferentes regiões do Brasil, levantando a suspeita de um ciclo natural desse protozoário entre os cães (Pinto et al. 2010; Barros et al. 2012; Oliveira et al. 2015).

Apesar de ser uma espécie ainda pouco estudada, trabalhos anteriores mostraram que a infecção natural por *T. caninum* pode cursar de forma assintomática apresentando baixos níveis de anticorpos (Madeira et al. 2014, Alves et al. 2012). Ademais, o isolamento de *T. caninum* foi realizado exclusivamente em pele íntegra (Madeira et al. 2009; Barros et al. 2012), fato não muito comum aos parasitas do gênero *Trypanosoma*.

T. caninum possui grande diversidade morfológica quando cultivados em meio axênico ou quando cocultivados com linhagens celulares (Barros et al. 2014; Fonseca- Oliveira et al. 2018). Um fato interessante, que tem chamado atenção, é a presença das formas epimastigota aflagelar (no cultivo axênico), uma forma incomum nas espécies desse gênero (Barros et al. 2014). Embora o ciclo biológico desse parasito ainda não seja conhecido, a partir de ensaios experimentais, foi mostrado que o cocultivo desse parasito com a linhagem

celular DH-82 estimulou a diferenciação para formas tripomastigotas, embora estas formas não foram capazes de infectar macrófagos dessa mesma linhagem (Fonseca-Oliveira et al. 2018).

Pouco se sabe sobre a biologia e epidemiologia de *T. caninum* e inúmeros aspectos precisam ainda ser investigados, principalmente relacionados ao ciclo natural. Isso leva a questionamentos como: Em que condições experimentais *T. caninum* é capaz de infectar células *in vitro*? Em que momento e de que forma ocorre a interação *T. caninum*-célula? Qual a forma evolutiva infectiva de *T. caninum* em ensaios *in vitro*? Neste contexto, esta dissertação focou em estudos experimentais de interação *T. caninum*-célula com propósito de trazer novas informações sobre os estágios deste parasito, principalmente avaliando a capacidade infectiva de formas epimastigotas aflagelares. E tem como hipótese que *T. caninum* é capaz de infectar experimentalmente células macrofágicas e que possui todas formas evolutivas descritas para o gênero *Trypanosoma*.

Vale ressaltar ainda, que todos os isolados de *T. caninum* foram descritos em áreas de sobreposição e compartilhando o mesmo hospedeiro (cão) com espécies de *Leishmania*, que tem importância em questões de saúde pública. Demonstrando que todas as espécies de tripanosomatídeos possuem o mesmo nível de importância nos cenários ecológicos e epidemiológicos. Sendo assim, todas as informações geradas neste estudo serão úteis no entendimento do papel de *T. caninum* no contexto biológico, epidemiológico e na relação parasito-hospedeiro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar aspectos morfológicos, biológicos e ultraestruturais da interação entre *Trypanosoma caninum* e células macrofágicas em modelos *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Conhecer o perfil de crescimento e diferenciação das formas evolutivas de *T. caninum* com predomínio de formas epimastigotas aflagelares em meio axênico e em cocultivo com a linhagem celular DH82;

2. Descrever características ultraestruturais das formas epimastigotas flagelares e aflagelares de *T. caninum* em meio axênico e em cocultivo com a linhagem celular DH82;

3. Avaliar aspectos da interação das formas epimastigotas aflagelares de *T. caninum*-célula em ensaios *in vitro* utilizando dois tipos distintos de células macrofágicas;

4. Analisar aspectos do processo de interação de *T. caninum*-célula em experimentos *in vitro* com relação ao ciclo biológico deste parasito.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolado de *Trypanosoma caninum*

Neste estudo foi utilizado o isolado de *Trypanosoma caninum* COLTRYP 735 depositado na Coleção de *Trypanosoma* de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores (COLTRYP/FIOCRUZ) no ano de 2017. Este isolado foi obtido em 2013 a partir de um fragmento de pele integra de cão proveniente do município do Rio de Janeiro. A amostra foi recuperada do nitrogênio líquido e transferida para um tubo contendo meio de cultura bifásico NNN (Novy MacNeal Nicolle) e Schneider's suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (200U de penicilina + 100µg de estreptomicina da Sigma-Aldrich®) à 27°C. A manutenção deste isolado foi realizada no mesmo meio de cultura, semanalmente, no Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos/LABTRIP/IOC/ FIOCRUZ.

3.2 Linhagem celular macrofágica canina (DH82)

A linhagem celular macrofágica canina (DH82), Código:0077, obtida junto ao banco de células do Rio de Janeiro, foi utilizada em cocultivo com *T. caninum* para conhecimento do perfil de crescimento e formas evolutivas do parasito e também utilizada em estudos da interação *T. caninum*-célula.

A célula foi retirada do nitrogênio líquido e estabilizada em 3mL de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose (LGC®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (200U de penicilina + 100µg de estreptomicina Sigma-Aldrich®), à 37°C/5% de CO₂. Após retirada do meio de cultura, a célula foi lavada por três vezes com PBS a 37°C. Para dissociação das células da garrafa foi realizada a tripsinização com 1mL de Tripsina-EDTA 0,25% (1x) (Gibco®) por garrafa, por no máximo 10 minutos a 37°C. Após, 3 a 4 mL de meio DMEM High Glucose (LGC®) gelado foi adicionado na garrafa para inativar o efeito da tripsina. O sobrenadante foi transferido para tubos de 15mL e centrifugado a 4500rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o pellet de células resuspendidos em

2 mL de DMEM High Glucose (LGC®) a 37°C. Posteriormente, 0,5mL da cultura de células foi adicionado em 4 mL do meio de cultura DMEM High Glucose (LGC®) em novas garrafas. A célula foi mantida em passagens que dependiam da confluência da célula. Quando as células estavam confluentes nas garrafas de cultura era realizada a passagem que ocorria no mínimo uma vez por semana. Todas as garrafas com as culturas de células possuíam a identificação do número da passagem e data. As condições para manutenção das células foram as mesmas descritas para estabilização e eram mantidas no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses (LaPClin VigiLeish) /INI.

3.3 Curva de crescimento de *T. caninum*

Foi realizada a curva de crescimento para obtenção de informações sobre a taxa de crescimento parasitária e para o conhecimento das formas evolutivas existentes de *T. caninum* durante o cultivo em meio axênico e em cocultivo com a linhagem celular DH82.

3.3.1 Meio axênico

A amostra de *T. caninum* COLTRYP 735 foi ampliada em meio de cultura NNN/Schneider a 27°C. Após contagem em câmara de Neubauer, a concentração inicial de 1×10^6 parasitos/mL foi transferida para uma garrafa de cultivo com área de 75cm^2 em 5mL de meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (200U de penicilina + 100µg de estreptomicina, Sigma-Aldrich®) à 27°C. Todo experimento foi realizado em triplicata.

A cada ponto da curva (intervalo de 48 horas) foi retirada uma alíquota da cultura para contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, na diluição da cultura em 1:100 em PBS. A contagem foi realizada em microscópio de campo claro na objetiva de 40x. Em seguida, o número de parasitos/mL foi determinado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de parasitos/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de parasitos}}{\text{N}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

As médias das triplicatas em cada ponto da curva foram calculadas para a confecção do gráfico da curva de crescimento e cálculo do desvio padrão.

3.3.2 Cocultivo com linhagem celular DH82

A curva de crescimento de *T. caninum* foi realizada em cocultivo com a linhagem celular DH82, em triplicata. A célula DH82 foi semeada em garrafa para cultivo celular de 75cm² em meio DMEM High glucose, suplementado com 10% de SFB, 200U de penicilina e 100µg de estreptomicina a 37°C/5% de CO₂ por 24 horas para estabilização da célula. Após contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, a curva de crescimento teve inóculo inicial de 0,8x10⁶ parasitos/mL em 5 mL do meio DMEM High glucose, suplementado com 10% de SFB, 200U de penicilina + 100µg de estreptomicina (Sigma-Aldrich®). Em intervalos de 48 horas e após o 14º dia em intervalo de 72 horas, foi realizada a contagem dos parasitos como descrito no item 3.3.1.

3.4 Quantificação das formas evolutivas de *T. caninum*

A cada ponto das duas curvas de crescimento foi realizada a quantificação das formas evolutivas de *T. caninum*. Foi realizada distensões de 30 µL do sobrenadante em lâminas de vidro, em duplicata. Em seguida, essas lâminas foram fixadas com metanol P.A (Vetec®); tratadas com ácido clorídrico 5N (HCl) por 10 minutos e corados pelo Giemsa (Merck®) tamponado por 15 minutos. Para cada ponto da curva de crescimento, foram contados 100 parasitos, diferenciando-os de acordo com sua forma evolutiva, por microscopia de campo claro, no microscópio Zeiss Axioplan.

3.5 Microscopia eletrônica de transmissão e varredura

Foi realizada a microscopia eletrônica de transmissão (MET) para análise ultraestrutural de *T. caninum* em meio axênico e em cocultivo com a linhagem celular DH82 (item 3.6).

Para análise da interação de *T. caninum* com macrófagos peritoneais e a linhagem celular DH82 (item 3.7) foram realizadas MET e microscopia eletrônica

de varredura (MEV). O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Biologia Estrutural/LBE/IOC/FIOCRUZ.

As etapas iniciais são iguais para MET e MEV: As amostras foram lavadas 3 vezes com PBS. Em seguida foram fixadas em glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 + 3,5% sacarose + 2,5mM CaCl₂ por 1 hora. Atingido o tempo, as amostras foram lavadas 3 vezes com o mesmo tampão. Após foi realizada a fixação de lipídeos com tetróxido de ósmio (OSO₄) 2% em tampão cacodilato 0,2M, pH 7,2 + 7% sacarose + 5mM CaCl₂, por 30 minutos e em seguida as amostras foram lavadas por 3 vezes com o mesmo tampão. A partir dessa etapa os protocolos de MET e MEV diferem e seguem abaixo.

Etapas para MET: Foi realizada a etapa de desidratação das amostras com concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 100%, 100% e 100%) por 10 minutos cada concentração em uma rotação de 4500 rpm. Após foi realizada a etapa de infiltração e emblocamento, com utilização da solução 1:1 de acetona 100% e resina (EPON) overnight. As amostras foram centrifugadas para formação do pellet no fundo da cápsula beam, a solução 1:1 de acetona/resina foi retirada e acrescentado apenas resina (EPON Poly Bed 812) e levada ao forno por 72h à 60°C. O bloco foi levado para a Plataforma de Microscopia Eletrônica da Fiocruz para processamento em cortes ultrafinos, recolhidos em grades de cobre, contrastado com chumbo e uranila e para obtenção das imagens no microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM-1011), pertencente à Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do IOC/FIOCRUZ.

Etapas para MEV: Após a pós fixação das amostras como descrito acima, as amostras foram submetidas a etapa da desidratação com etanol em concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90%, 100% e 100%) por 10 minutos. Em seguida as amostras foram submetidas ao ponto crítico (mudança de estado físico de CO₂ dentro da célula), metalização (revestimento da amostra com nano partículas de ouro para liberação de elétrons) e obtenção de imagens pelo microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-6390LV) pertencente à Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do IOC/FIOCRUZ.

3.6 Análise ultraestrutural de *T. caninum* em meio axênico e em cocultivo com a linhagem celular canina

Para a análise ultraestrutural de *T. caninum* em cultura axênica foi necessário ampliarmos por 3 a 7 dias o parasito em meio NNN/Schneider suplementado com SFB a 10% e antibióticos (200U de penicilina + 100µg de estreptomicina, Sigma-Aldrich®), mantidos em estufa a 27°C. Entre o terceiro e sétimo dia, recolhemos o sobrenadante do cultivo.

Para a análise das formas evolutivas de *T. caninum* em cocultivo com a linhagem celular DH82, o parasito foi inoculado em garrafa contendo células DH82 previamente estabilizadas em 5mL de meio DMEM High Glucose (LGC®) e permaneceu em cocultivo pelo tempo determinado na curva de crescimento como o dia que apresentou maior diversidade de formas evolutivas.

Os sobrenadantes das culturas foram centrifugados por 10 minutos a 4500 rpm, lavados com PBS e processadas como descrito no item 3.5 para análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3.7 Interação entre *T. caninum*-célula

A interação de *T. caninum* com a linhagem celular DH82 e com macrófagos peritoneais foi analisada pelas técnicas de microscopia de campo claro (MCC), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O experimento foi realizado em duas condições diferentes: (1) em meio de cultura DMEM/F12 suplementado com SFB a 10% e (2) em meio de cultura DMEM/F-12 suplementado com albumina sérica bovina (BSA) a 2% acrescido de 100 unidades da solução penicilina e estreptomicina (Gibco®).

O experimento foi realizado para análise por MCC e MEV em placas de 24 poços em que continham lamínulas de vidro de 13mm e para análise por MET em placas de 100mm. Em todas as condições e tempos foi inserido um controle composto apenas pelas células, isentas de parasitos.

A cinética para MCC e MEV foi realizada em 7 tempos: 15, 30 e 45 minutos e 2, 6, 24 e 48 horas. A cinética para MET foi determinada nos tempos

que apresentaram informações relevantes sobre a interação após análise em MCC e MEV. O experimento foi realizado em triplicatas para análise por MCC, e duplicatas para análise em MEV e MET.

3.7.1 Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82

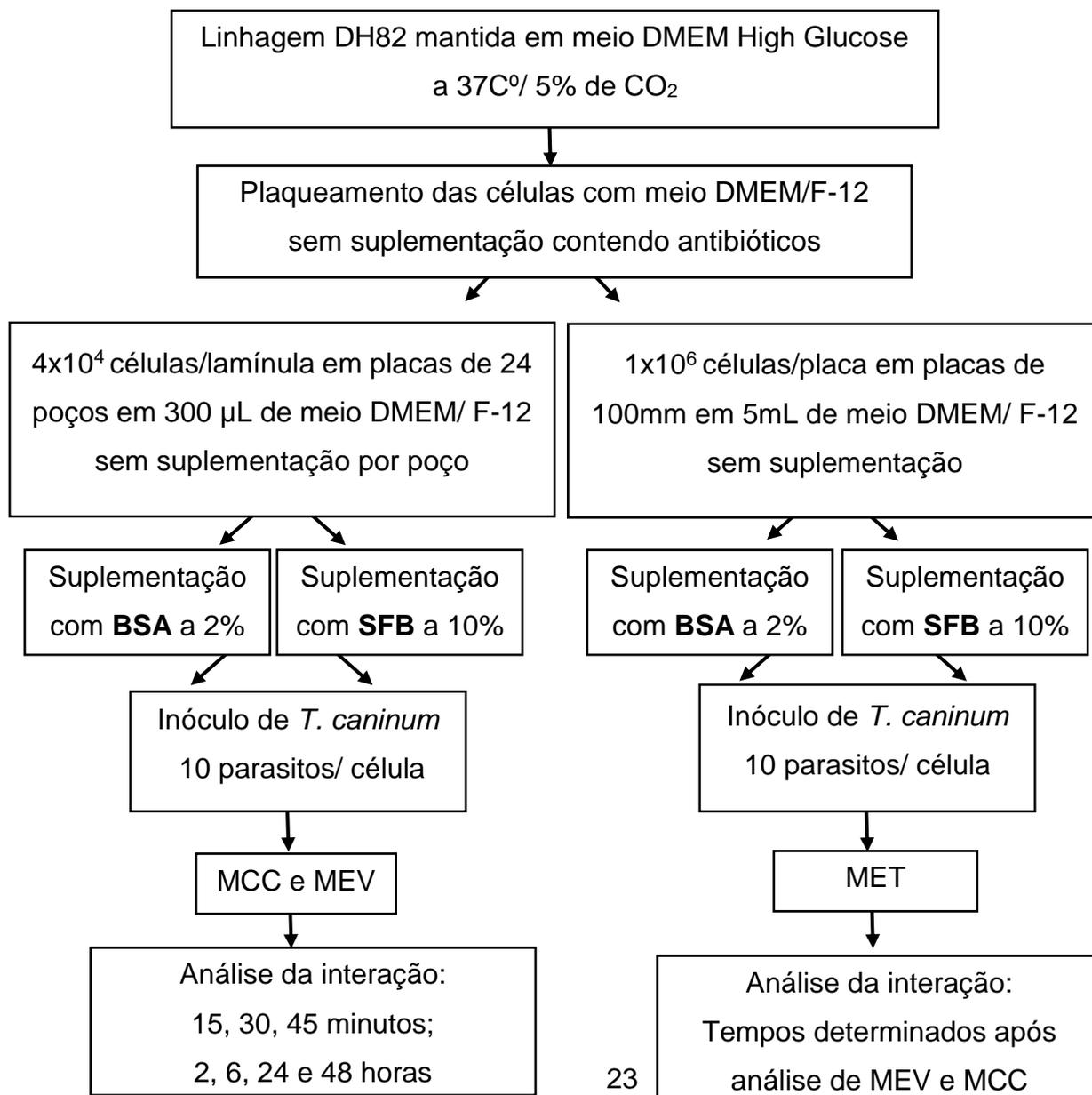
As células da linhagem DH82 foram lavadas com PBS aquecido em banho-maria a 37°C e dissociadas com 1mL de tripsina por garrafa à 37°C em estufa de CO₂ por até 10 minutos para que todas as células soltassem das garrafas. Após a dissociação das células, a tripsina foi inativada com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/ F-12) sem suplementação e contendo antibióticos (100 unidades de penicilina e estreptomicina da Gibco®) gelado (2-8°C). A cultura de células foi centrifugada à 4500 rpm por 10 minutos e ressuspendida no mesmo meio usado para inativação da tripsina. Após homogeneização foi retirada uma alíquota para diluição (1:1000) em PBS e em azul de tripan, para comprovar a viabilidade celular e contagem em câmara de Neubauer para o plaqueamento das células. Foram plaqueadas 4X10⁴ células/mL por poço em um volume total de 300µL do meio DMEM/F-12 sem suplemento e contendo 100 unidades de penicilina e estreptomicina (Gibco®) em placas de cultura de 24 poços. Em placas de 100mm, foi plaqueada 1X10⁶ células/mL em 5mL do mesmo meio em duplicata. Após 1 hora, o sobrenadante foi retirado das placas e acrescentado em metade das placas o meio de cultura DMEM/F-12 suplementado com SFB a 10% e na outra metade o meio de cultura DMEM/F-12 suplementado com BSA a 2% em volume total de 300µL nas placas de cultura de 24 poços e volume total de 5mL nas placas de 100mm. Em seguida as células foram acondicionadas em estufa a 37°C/5% de CO₂ por 24 horas.

Após esse tempo, os parasitos foram ampliados em meio NNN/Schneider suplementado com 10% de SFB e antibióticos (100 unidades de penicilina e estreptomicina gibco®), transferidos para tubos de 15 mL e centrifugados a 4500 RPM por 10 minutos e ressuspendidos em meio DMEM/F-12 sem suplementação contendo antibióticos (100 unidades de penicilina e estreptomicina gibco®). Após alíquota foi diluída 1:1000 em PBS e azul de Tripan para comprovar a viabilidade do parasito e contagem em câmara de Neubauer.

Após contagem dos parasitos, foi inoculada em cada placa a concentração de 10 parasitos/célula (10:1). Em cada tempo da cinética as lamínulas foram lavadas com tampão PBS e fixadas com metanol P.A (Vetec®). Após, foram coradas com Giemsa (Merck®) tamponado por 2 a 4 minutos e em seguida montadas com Entellan (Merck®) em lâminas de vidro para análise por MCC no microscópio Zeiss Axioplan em aumento de 100x.

Já as demais lamínulas e placas de 100mm, foram fixadas com Glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 + 3,5% sacarose + 2,5mM CaCl₂ por uma hora e lavadas três vezes com o mesmo tampão e processadas como descrito no item 3.5 para análise por microscopia eletrônica.

Desenho experimental



3.7.2 Interação entre *T. caninum* e células primárias de Macrófago Peritoneal

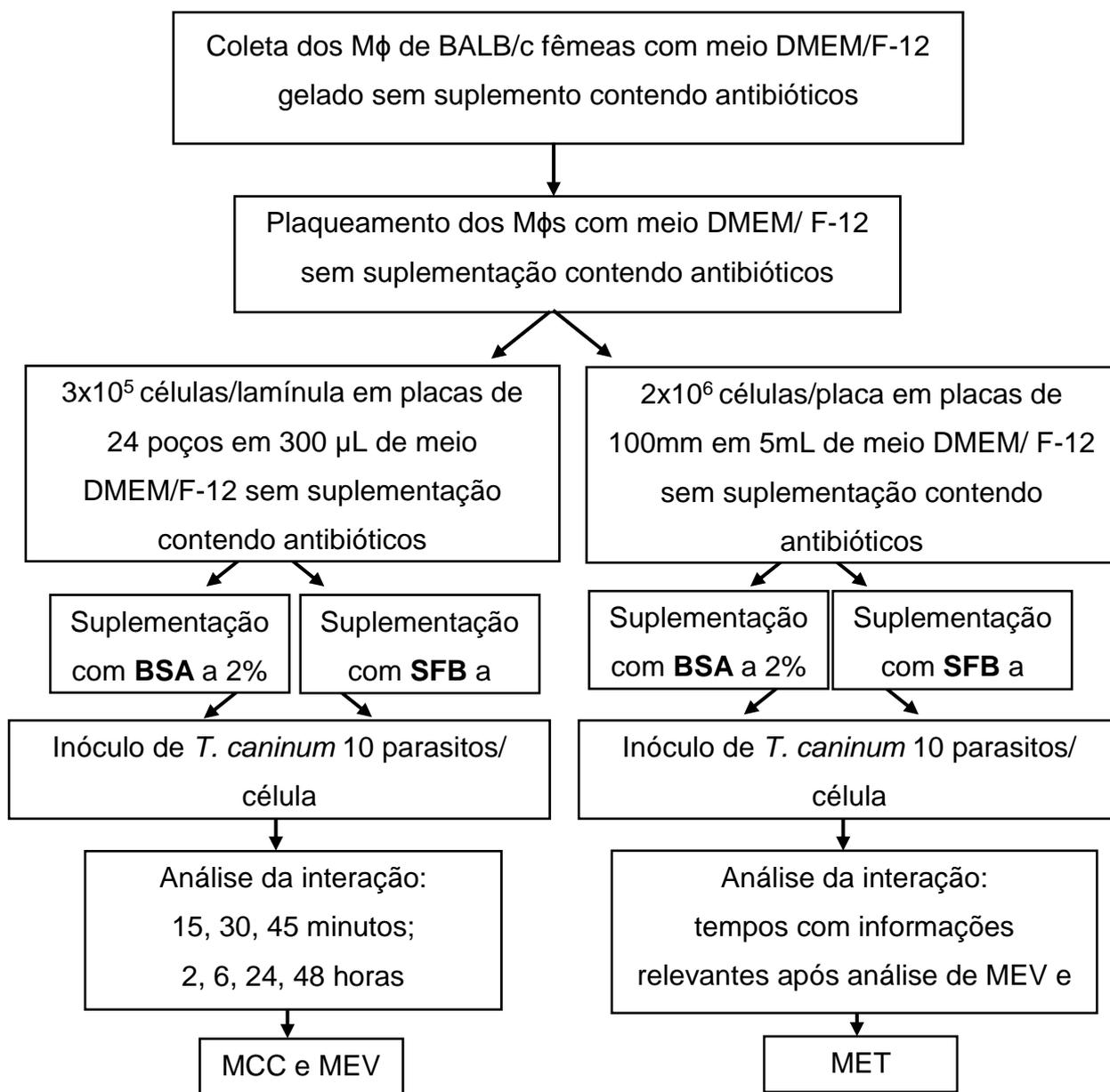
Os macrófagos peritoneais (Mφs) foram obtidos a partir da lavagem peritoneal de camundongos fêmeas com 18 a 20 gramas da linhagem BALB/c. Após a eutanásia com a associação entre cloridato de xilazina e cloridato de quetamina, os camundongos passaram por assepsia com banho em álcool etílico 70%. Após, foram presos, em decúbito dorsal, em suporte de cortiça com uma pinça dente de rato, a pele foi levantada. Cerca de 10 mL de meio de cultura gelado DMEM/F-12 sem suplementação (Gibco®), com 100 unidades de penicilina e estreptomicina (Gibco®), foram introduzidos na cavidade peritoneal do animal e retirado lateralmente ao mesmo, utilizando seringa e agulha estéreis. Após massagem nessa região, o meio introduzido foi aspirado com a mesma seringa, sendo imediatamente acondicionado em gelo. Todo protocolo para obtenção das células foi aprovado de acordo com o Comissão de ética no uso de animais (CEUA licença L-027/2018).

Após a coleta dos macrófagos, uma alíquota foi diluída 1:100 em PBS e esta diluição foi diluída 1:1 em azul de Tripán para comprovar a viabilidade celular. As células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na concentração de 3×10^5 células/lamínula em placas de 24 poços em volume total de 300 μ L do mesmo meio usado para obtenção dos macrófagos a 37°C e concentração de 2×10^6 células/ placa de 100mm em volume total de 5mL do mesmo meio. Após 1 hora do plaqueamento, o meio de cultura foi retirado e acrescentado o meio DMEM/F-12 com SFB a 10% e 100 U de penicilina e estreptomicina (Gibco®) em metade das placas de 24 poços e de 100mm. No restante das placas e foi acrescentado meio DMEM/F-12 suplementado com BSA 2% e 100 U de penicilina e estreptomicina (Gibco®). Após 24 horas o parasito foi inoculado na concentração de 10 parasitos/célula, sendo 3×10^6 parasitos/célula nas placas de 24 poços e 20×10^6 parasitos/célula nas placas de 100mm.

Em cada tempo determinado, as lamínulas foram lavadas com tampão PBS, e fixadas com Metanol P.A (Vetec®). Após, foram coradas com Giemsa (Merck®) tamponado por 2 a 4 minutos e em seguida montadas com Entellan (Merck®) em lâminas de vidro para análise por MCC no microscópio Zeiss Axioplan em aumento de 100x.

Já as demais lamínulas e placas de 100mm, foram fixadas com Glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 + 3,5% sacarose + 2,5mM CaCl₂ por uma hora e lavadas três vezes com o mesmo tampão e processadas como descrito no item 3.6 para análise por microscopia eletrônica.

Desenho experimental:



3.8 Análises das taxas de adesão e infecção

Foi realizada a quantificação das lamínulas confeccionadas durante o estudo de interação entre *T. caninum* e as células macrofágicas para a técnica de MCC. Foi realizada a contabilização em 200 células por lamínula de cada tempo da cinética, das células infectadas, número de parasitos interiorizados e aderidos, com o intuito de analisar se havia diferenças estatísticas na infecção entre as células DH82 e Mφ, entre as condições (SFB e BSA) em cada célula, entre lamínulas e a ocorrência de adesão e infecção concomitantemente.

Para a análise da porcentagem da taxa de infecção, a contagem do número de células infectadas foi inserida na fórmula abaixo:

$$\% \text{ células infectadas} = \frac{\text{n}^\circ \text{ células infectadas}}{\text{n}^\circ \text{ total de células}} * 100$$

Na utilização do cálculo da taxa de adesão, a fórmula foi a mesma, sendo substituído o número de células infectadas pelo número de parasitos aderidos. Assim também ocorreu para a análise da taxa de infecção e adesão que ocorriam na mesma célula, foi somado o número de células que estavam infectadas e com parasitos aderidos ao mesmo tempo e o valor obtido foi inserido na fórmula citada acima.

As tabelas foram confeccionadas no Excel 2013 e os dados foram plotados no programa Prisma 7 para a confecção dos gráficos.

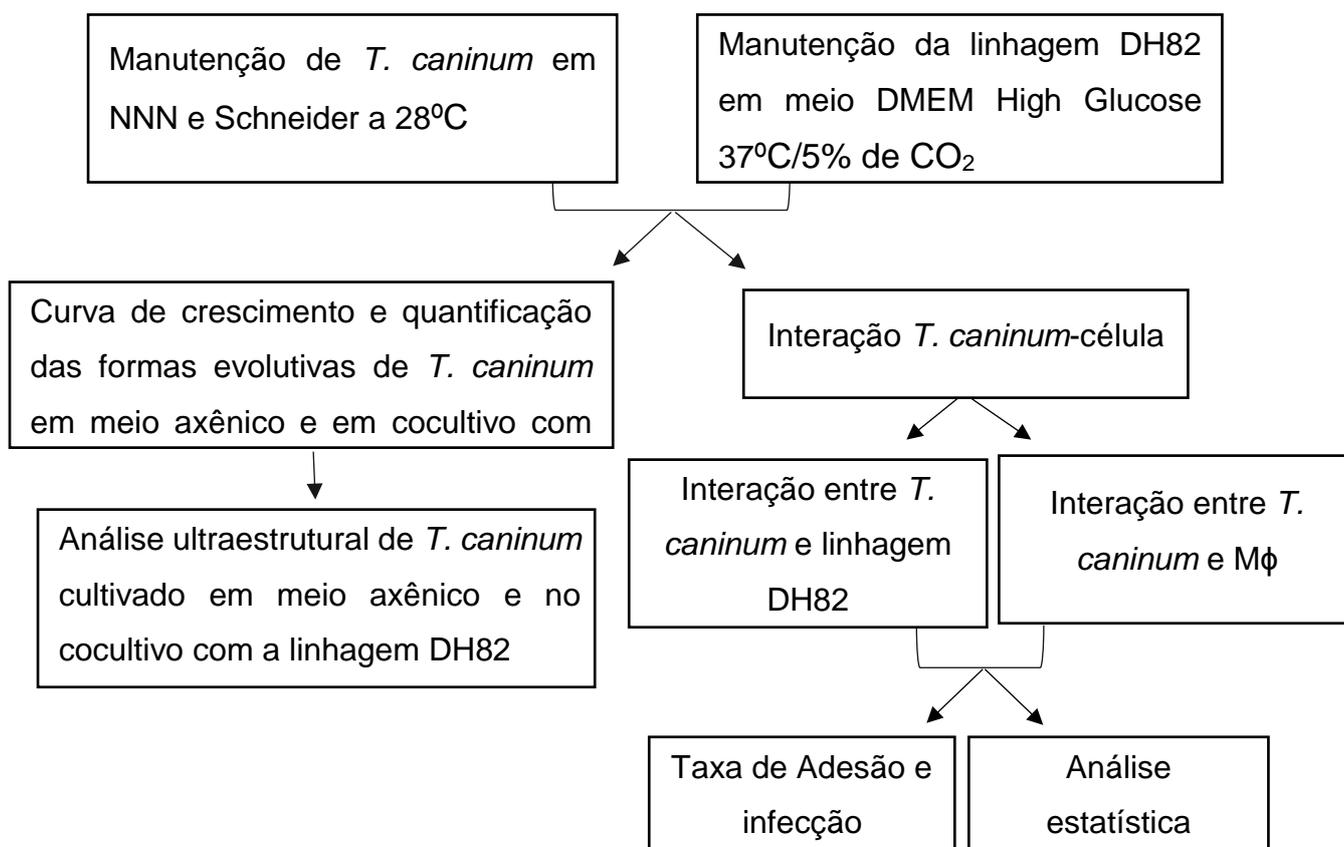
3.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada a partir de contagem aleatória de 200 células em duas lamínulas, contabilizando um total de 400 células por cada tempo de cada experimento.

Os valores resultantes da quantificação de células que obtinham parasitos aderidos (taxa de adesão), células com parasitos interiorizados (taxa de infecção), células que possuem os dois eventos (adesão e infecção) ao mesmo tempo e a quantidade de parasitos interiorizados entre as condições do meio de

suplementação (SFB e BSA) e entre as duas células (DH82 e M ϕ), foram plotados para a realização dos testes de normalidade, homogeneidade e autocorrelação, que antecederam a análise estatística através do teste Anova: Fator Único, teste que trabalha com a hipótese que a distribuição de probabilidades é a mesma. Nesse teste foi utilizada a comparação das médias cujo nível de decisão alfa adotado foi $\leq 0,05$. Após, foi realizado o Teste-T: Amostra Dupla Presumindo Variações Equivalentes com a hipótese que a variância é igual, sendo usada para determinar se existe a possibilidade de as amostras serem provenientes de grupo de amostras com médias iguais. A hipótese testada em ambos os testes estatísticos foi que não há diferença entre as médias (H_0) e como hipótese alternativa que há diferenças entre as médias (H_1). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa R© version 3.6.0(2019-04-26).

Desenho experimental do estudo:



4 RESULTADOS

4.1 Curva de crescimento

A curva de crescimento de *T. caninum* em meio axênico, teve inóculo inicial de 1×10^6 parasitos/mL. Sua fase exponencial de crescimento (fase log) foi até o 14º dia com $11,35 \times 10^6$ parasitos/mL. A curva não apresentou fase estacionária, seguindo diretamente para fase de declínio apresentando no 20º dia, $5,57 \times 10^6$ parasitos/mL (gráfico 1). O desvio padrão foi de $\pm 3,04$.

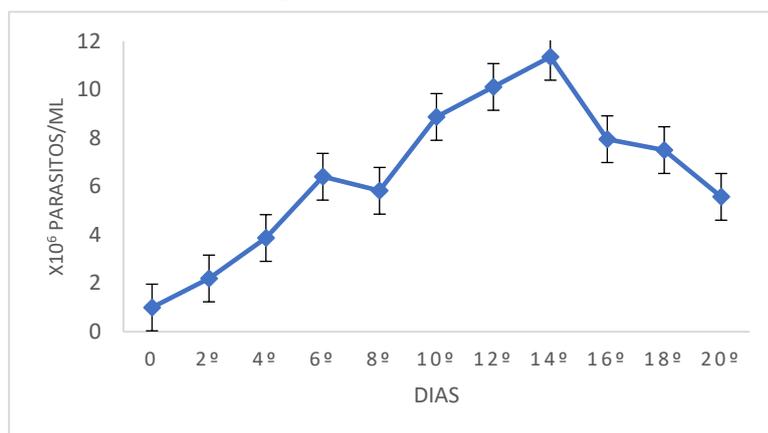


Gráfico 1: Curva de crescimento do *T. caninum* em meio Schneider + 10% SFB a 27°C. O inóculo inicial foi de 1×10^6 parasitos/mL. Pico da fase log no 14º com $11,35 \times 10^6$ parasitos/mL.

A curva de crescimento do *T. caninum* em cocultivo com a linhagem celular teve inóculo inicial de $0,8 \times 10^6$ parasitos/mL, apresentando a fase log até o 10º dia ($4,3 \times 10^6$ parasitos/mL) e seguida diretamente da fase de declínio. As médias das triplicatas resultaram em desvio padrão de 1,11 (gráfico 2).

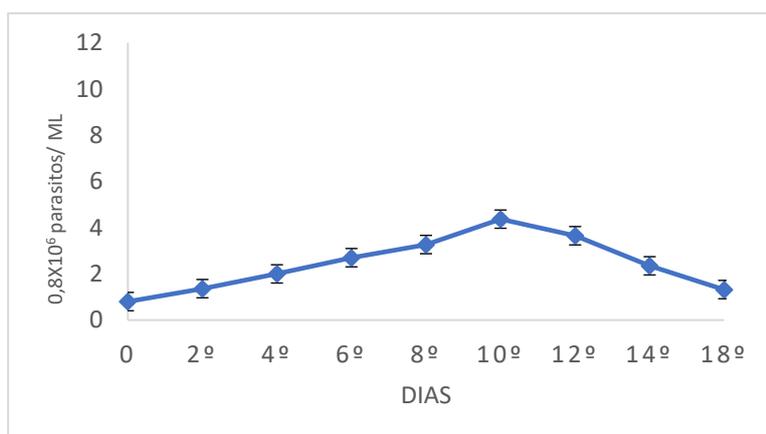


Gráfico 2 : Curva de crescimento de *T. caninum* em cocultivo com a célula DH82 a 37°C/ 5% de CO₂. O inóculo inicial foi de $0,8 \times 10^6$ parasitos/mL. O pico da fase log foi de 10º dia com $4,3 \times 10^6$ parasitos/mL.

4.2 Análise quantitativa das formas evolutivas durante da curva de crescimento

A curva de crescimento de *T. caninum* em meio axênico iniciou com 92% de formas epimastigotas aflagelares e 8% de epimastigota flagelar. Ao longo de toda a curva foi observada apenas estas duas formas. A partir do 4º dia da curva houve aumento da forma epimastigota aflagelar, atingindo a 100% desta forma no 12º dia, se mantendo assim até o 20º dia. O 2º dia foi o que apresentou maior porcentagem de epimastigota flagelar (10%), sendo visualizadas até o 10º dia (gráfico 3). Dados com valores da quantificação em cada dia estão dispostos na tabela 1.

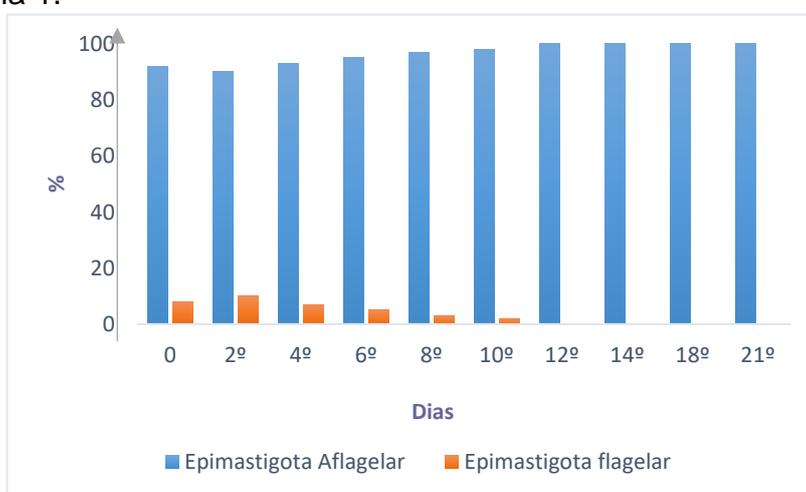


Gráfico 3: Quantificação das formas evolutivas de *T. caninum* em cada ponto da curva de crescimento em meio axênico. No início da curva de crescimento havia 92% de formas epimastigotas aflagelares (EA) e 8% de epimastigota flagelar (EF). A forma EF não foi mais visualizada a partir do 12º dia, apresentando 100% de formas EA.

Tabela 1 : Quantificação das formas evolutivas de *T. caninum* em cada ponto da curva de crescimento em meio axênico.

Dias	0	2º	4º	6º	8º	10º	12º	14º	18º	21º
Epimastigota Aflagelar	92%	90%	93%	95%	97%	98%	100%	100%	100%	100%
Epimastigota Flagelar	8%	10%	7%	5%	3%	2%	-	-	-	-

Durante a curva de crescimento de *T. caninum* em cocultivo com a linhagem celular DH82 foi possível observar que o inóculo inicial apresentava 92% da forma epimastigota aflagelar e 8 % de epimastigota flagelar. Até o 6º dia houve um decréscimo da forma epimastigota aflagelar e crescimento de epimastigota flagelar. A partir do 8º dia foi observada a presença de 100% de formas epimastigota flagelar. No 10º dia houve o aparecimento da forma

tripomastigota (1%). A partir do décimo segundo dia até o décimo oitavo houve uma maior variedade de formas evolutivas. epimastigota (86%), tripomastigota (10%) e esferomastigota (4%). No décimo oitavo dia havia 76% de formas epimastigotas flagelares, 23% de esferomastigotas e 1% de tripomastigotas (gráfico 4). A quantificação da curva de crescimento está disposta na tabela 2.

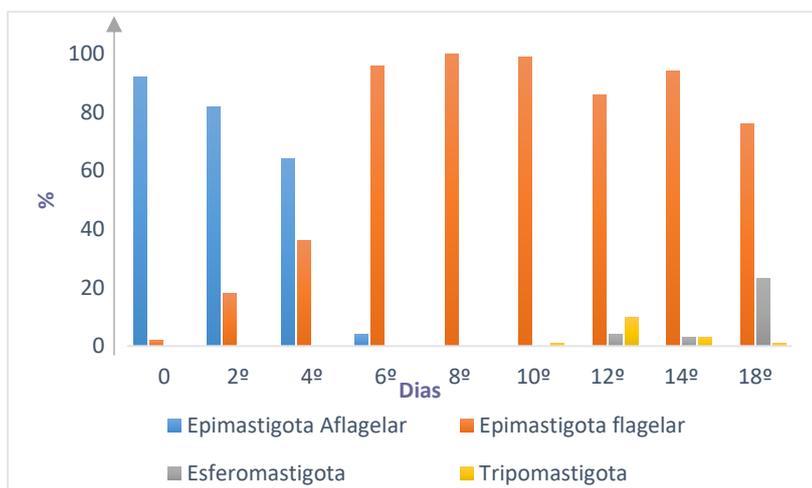


Gráfico 4 : Quantificação das formas evolutivas de *T. caninum* na curva de crescimento em cocultivo com a linhagem celular DH82. No início da curva de crescimento havia 92% de formas epimastigotas aflagelar (EA) e 8% de epimastigota flagelares (EF). A partir do décimo segundo dia apresentou a maior diversidade de formas evolutivas: EF, tripomastigota e esferomastigota.

Tabela 2 : Quantificação das formas evolutivas de *T. caninum* na curva de crescimento em cocultivo com a linhagem celular DH82.

Dias	0	2º	4º	6º	8º	10º	12º	14º	18º
Epimastigota aflagelar	92%	82%	64%	4%	-	-	-	-	-
Epimastigota flagelar	2%	18%	36%	96%	100%	99%	86%	94%	76%
Esferomastigota	-	-	-	-	-	-	4%	3%	23%
Tripomastigota	-	-	-	-	-	1%	10%	3%	1%

As curvas de crescimento de *T. caninum*, em meio axênico e em cocultivo com linhagem DH82, apresentaram o mesmo perfil de crescimento. No entanto no pico da fase exponencial, a curva em meio axênico apresentou $11,35 \times 10^6$ parasitos/mL e em cocultivo com a linhagem celular DH82 $4,3 \times 10^6$ parasitos/mL, quase três vezes mais parasitos. Neste mesmo momento, na curva em meio axênico foi observada apenas a forma evolutiva epimastigota

aflagelar e na curva em cocultivo com a linhagem DH82 foram identificadas as formas epimastigota flagelar e tripomastigota.

4.3 Análise ultraestrutural de *T. caninum*

Foi realizada a análise ultraestrutural de *T. caninum* do 12º dia de cocultivo com a linhagem celular DH82. Esse dia foi o escolhido por apresentar a maior diversidade de formas evolutivas: epimastigota flagelar, esferomastigota e tripomastigota. Na figura 5 A, é possível observar uma imagem quase que total do corpo do parasito. Foi possível observar estruturas como o núcleo (N) (Figura 5 B), os microtúbulos subpeliculares (MS) modulando a estrutura do parasito (Figura 5C), vários corpúsculos lipídicos (CL) distribuídos pelo corpo do parasito (figura 5B), cinetoplasto (C) com material genético denso (figura 5A), mitocôndria (M) única ramificada (figura 5D), bolsa flagelar (5F) contendo flagelo (F) (figura XD). É possível observar ausência de microtúbulos subpeliculares na bolsa flagelar (figura 5D).

Na análise das ultraestruturas de *T. caninum* mantido em cultivo axênico entre o 3º e 7º dia, por ser o período em que havia as formas epimastigota aflagelar e flagelar. Foi possível evidenciar diversas estruturas, como: a presença da bolsa flagelar (BF) vazia, característico da forma epimastigota aflagelar (figura 6C), núcleo bem estruturado (N) (figura 6B), cinetoplasto (C) composto por material genético compactado, os corpúsculos lipídicos que são estruturas eletrodensas de diferentes tamanhos envoltas apenas por uma membrana, ao longo do corpo parasitário (CL) (figura 6B), microtúbulos subpeliculares (MS) formando a estrutura do corpo do protozoário (figura 6D), mitocôndria (M) única, ramificada distendida pelo corpo do parasito (figura 6D), perfil do retículo endoplasmático (RE) bem distribuído ao longo do corpo celular (figura 6 E e F).

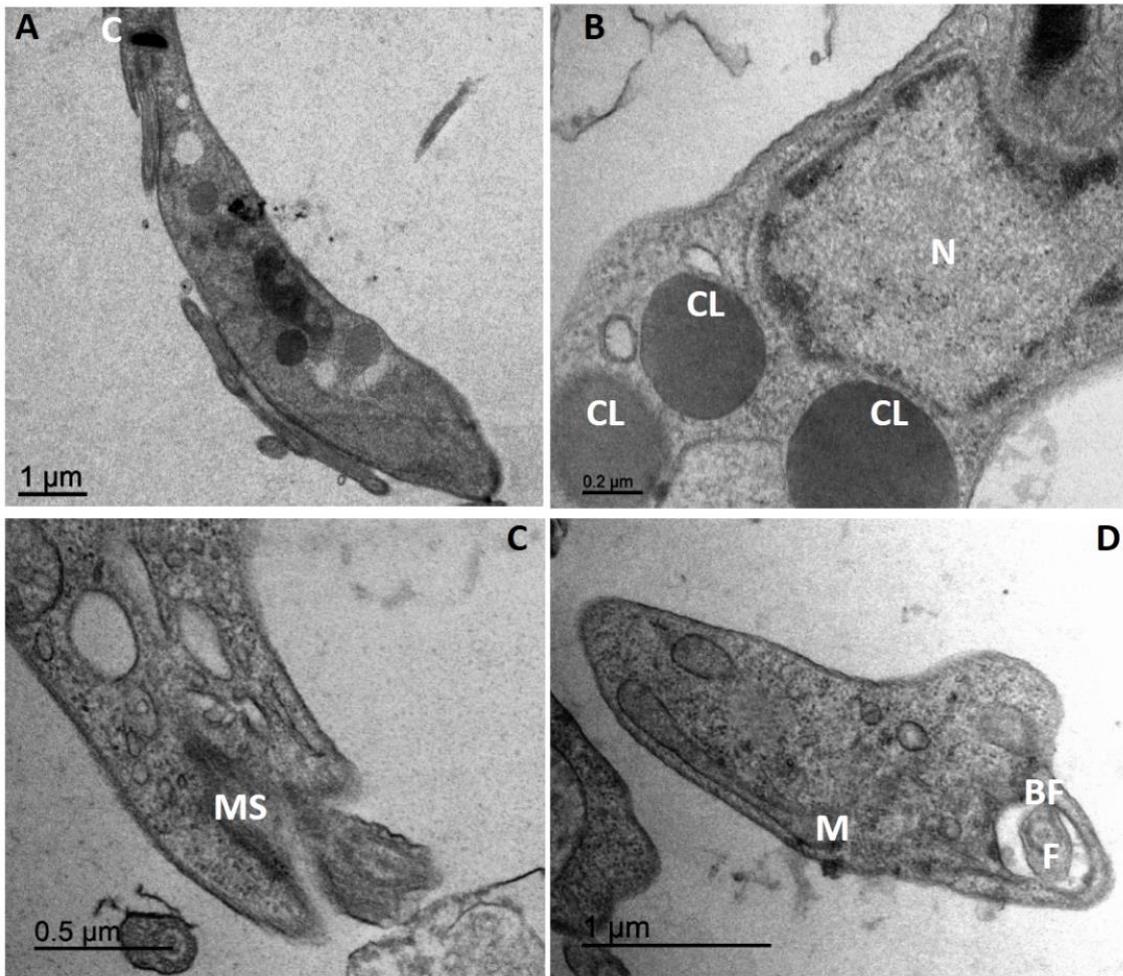


Figura 5: Micrografia eletrônica de transmissão das ultraestruturas de *T. caninum*, em cocultivo com a linhagem celular DH82. A: Corpo do parasito e detalhe do cinetoplasto (C); B: evidências de corpúsculo lipídico (CL), núcleo (N); C: detalhe de microtúbulos subpeliculares (MS); D: Mitocôndria (M) ao longo do corpo do parasito, detalhe da bolsa flagelar(BF) e flagelo (F);

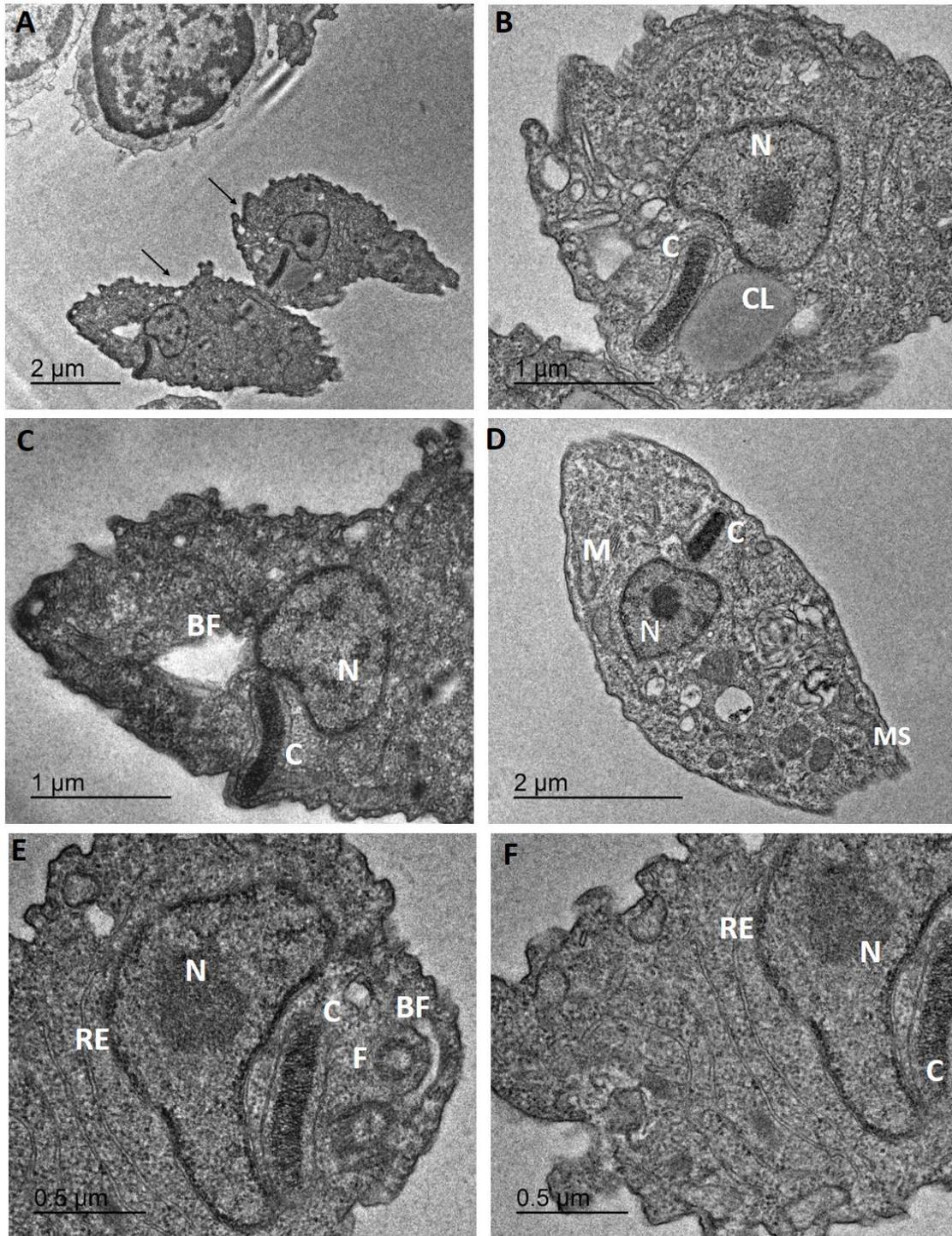


Figura 6: Micrografia eletrônica de transmissão das ultraestruturas de *T. caninum* em meio axênico com predomínio de formas epimastigotas aflagelares. A: parasitos aflagelares; B: detalhe do cinetoplasto(C), corpúsculo lipídico (CL), núcleo (N); C: perfil da bolsa flagelar (BF); D: parasito com cinetoplasto ao lado do núcleo, mitocôndria (M) e microtúbulos subpeliculares (MS); E: detalhe do núcleo (N), bolsa flagelar (BF) contendo o flagelo (F), perfil do retículo endoplasmático (RE); F: detalhe do perfil do retículo endoplasmático (RE) distribuído ao longo do corpo do

4.4 Estudo da interação *T. caninum* - célula

Foi realizada o estudo da interação de *T. caninum* com duas células macrofágicas, (1) linhagem celular canina DH82 e (2) células primárias de camundongos. Nossos resultados demonstram a interação de *T. caninum* com ambas células e infecção desde o estágio inicial da cinética.

Durante a transcrição dos resultados na tentativa de deixar mais claro o entendimento foi adotado o termo adesão para parasito na forma epimastigota aflagelar quando em contato com a célula, refletindo a entrada do parasito na célula. Já quanto à forma amastigota, foi determinada a utilização do termo interação, visto que a amastigota poderia estar entrando na célula ou saindo.

4.4.1 Interação *T. caninum* – linhagem celular DH82 (TC-DH82)

Ao longo de toda a cinética foi possível observar interação entre *T. caninum* e a linhagem celular DH82, tanto na condição com meio de cultura suplementado com BSA quanto com SFB. Desde o início da cinética foi possível identificar *T. caninum* interagindo e infectando a célula, na forma epimastigota aflagelar e se diferenciando para a forma amastigota. Detalhes observados foram descritos de acordo com o tempo de interação e demonstradas por três técnicas de microscopia: microscopia de campo claro (MCC), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

15 minutos de interação (TC-DH82)

Nesse tempo de interação, com meio suplementado com SFB, foi visualizada a adesão de parasitos epimastigotas aflagelares com a célula pela porção anterior do parasito, formas epimastigotas aflagelares livres (Fig.7A e C) e divisão parasitária (Fig.7B) pela técnica de MCC. Também foram observadas, interiorização de epimastigota aflagelar (Fig. 7D), amastigotas interagindo com os prolongamentos da célula (Fig. 7E e F). Pela técnica de MEV, como descrito em MCC, foi notada adesão de epimastigota aflagelar na linhagem celular DH82 por todo o corpo, pela porção anterior ou posterior, não apresentando um único padrão (Fig. 9 A- C), (Fig.9 A e D).

Na condição com meio suplementado com BSA foram observadas poucas células dispostas ao longo das lamínulas, quando comparadas com SFB. Foi possível notar parasitos na forma epimastigota aflagelar aderidos (Fig. 8 A e B)

e amastigotas internalizadas (Fig.8 D). Pela técnica de MEV, foi visualizado a adesão de epimastigotas aflagelares (Fig.10 A-C) e a presença de amastigota em interação com os prolongamentos celulares (Fig.10D). Nota-se a presença de muitos vacúolos na célula em ambas as condições, tanto com meio suplementado com SFB, quanto com BSA (Fig.7A, E e F e Fig. 8C).

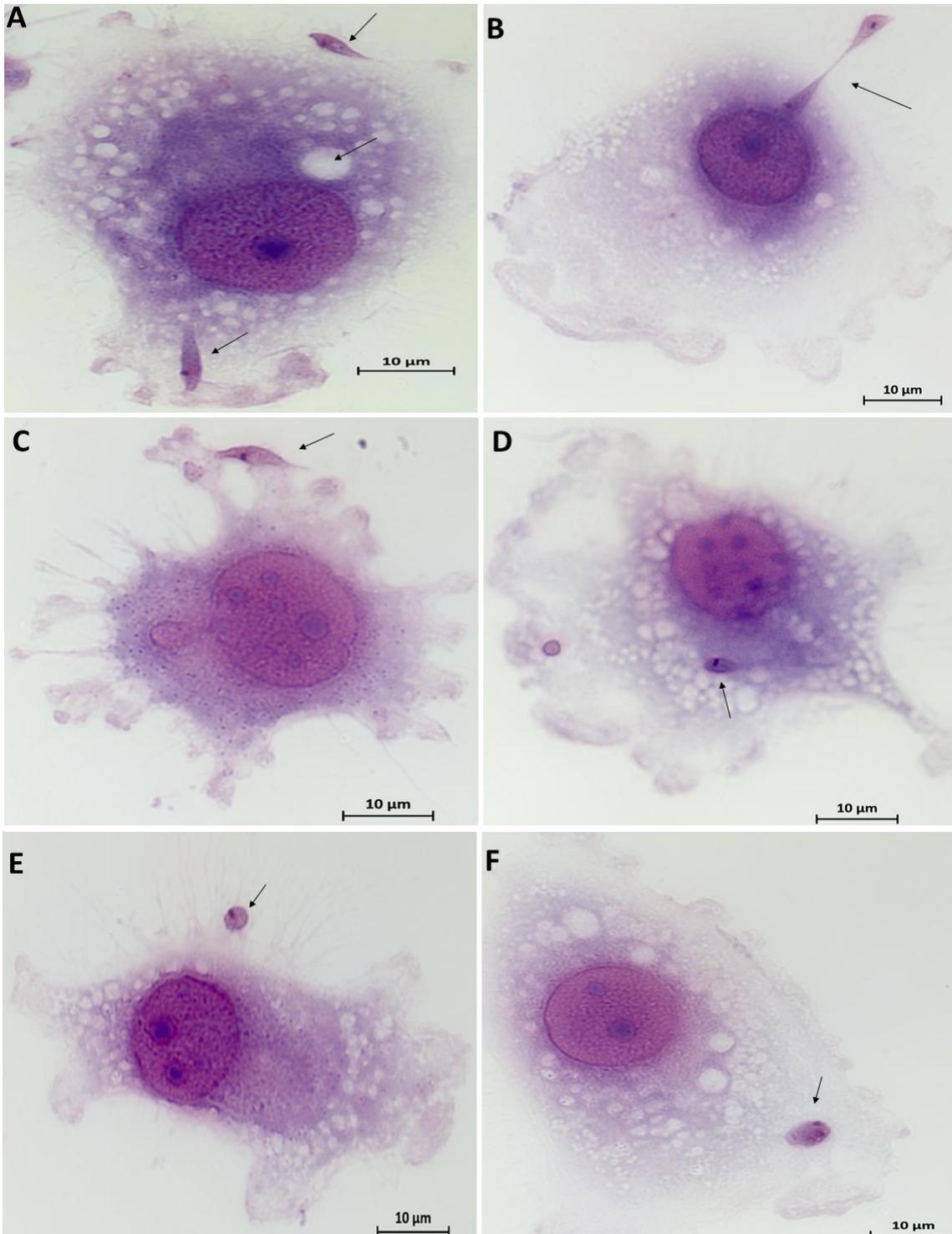


Figura 7: Interação entre *T. caninum* e linhagem DH82, no tempo de 15 minutos na condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: parasito livre e adesão de epimastigota aflagelar (EA) pela porção anterior do

corpo parasitário (setas); **B**: divisão de EA (seta); **C**: em destaque, adesão de parasitos pela porção anterior e por todo o corpo do parasito em prolongamentos da célula (seta); **D**: interiorização de EA(seta); **E e F**: amastigota interagindo com a célula (seta);

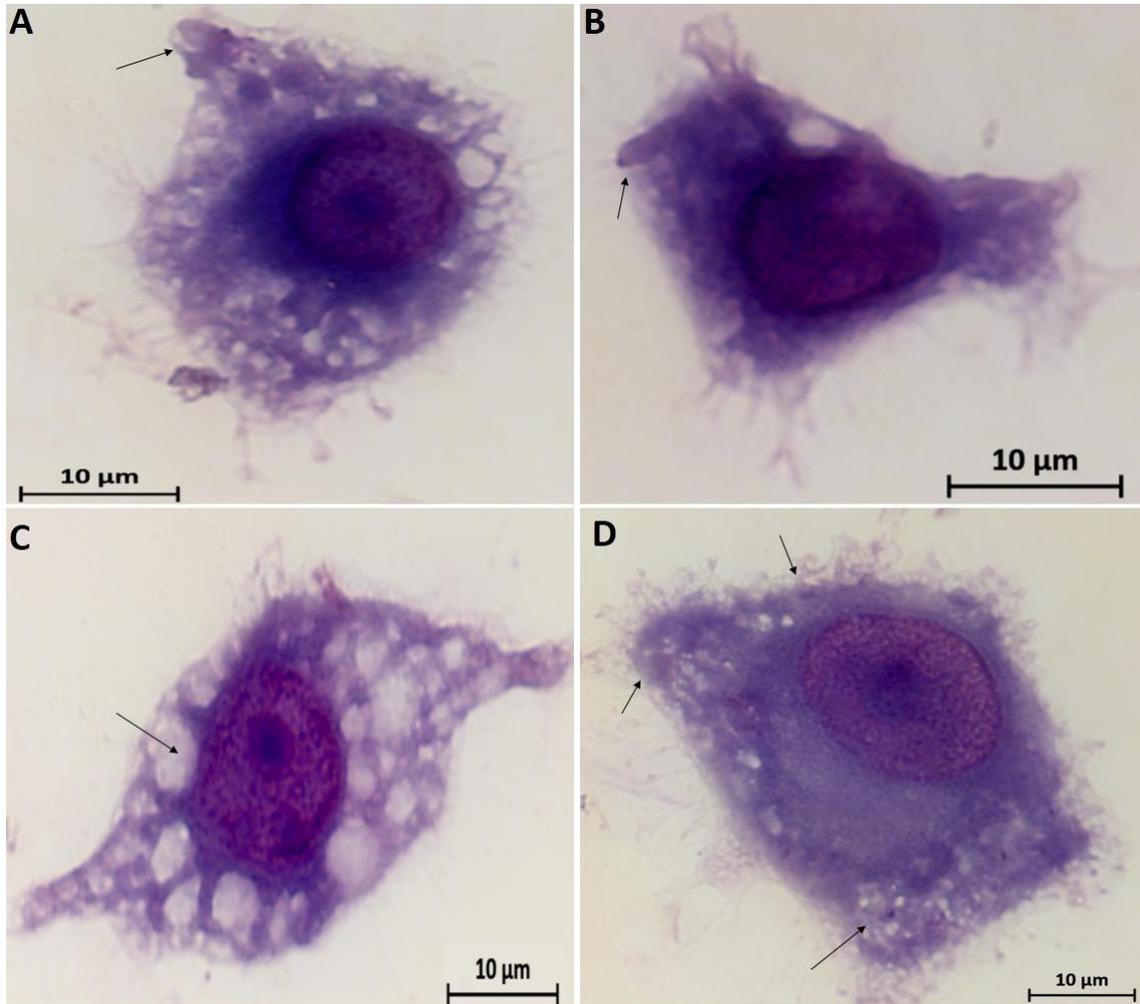


Figura 8 : Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82 no tempo de 15 minutos na condição com meio suplementado com BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A e B: epimastigotas aflagelar aderidas a célula (seta); C: célula com inúmeros vacúolos (seta); D: amastigotas interiorizadas (setas);

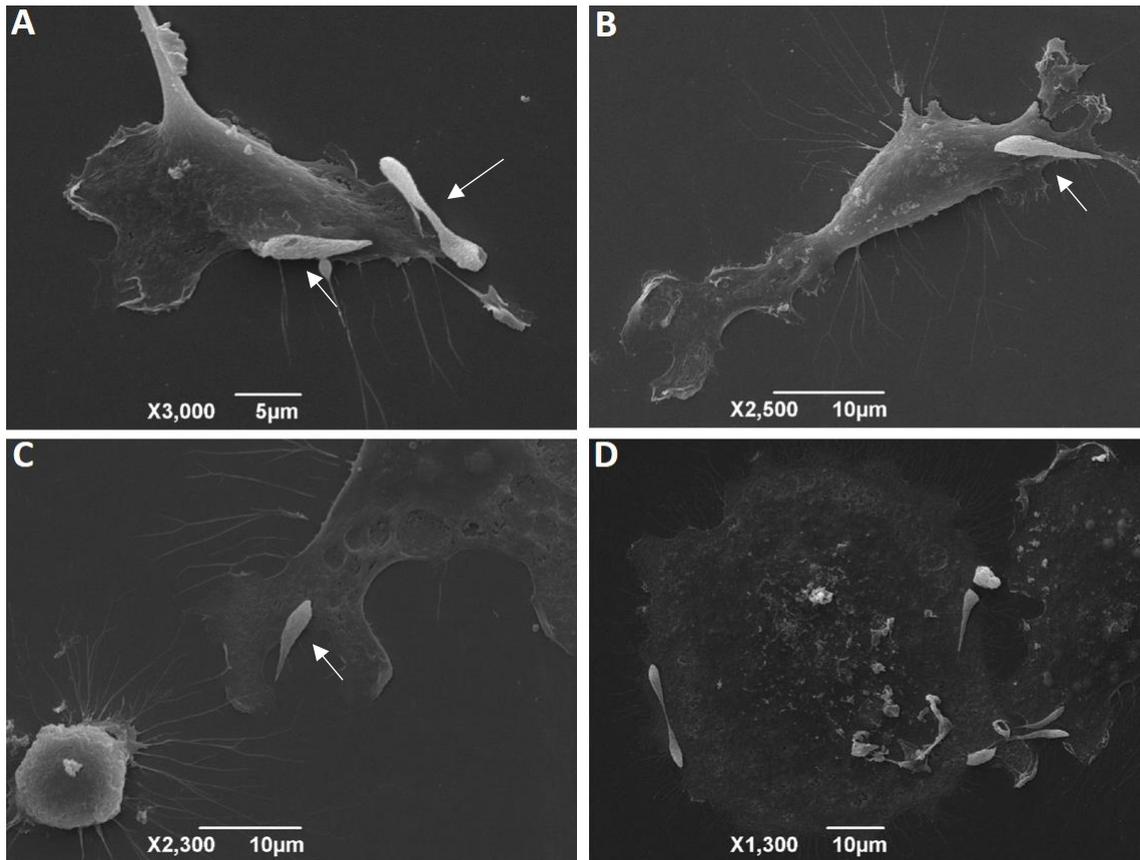


Figura 9: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82, no tempo de 15 minutos na condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: adesão de *T. caninum* e parasito em divisão (setas); B, C: adesão de epimastigota aflagelar (EA) (seta); D: parasito em divisão e em mudança de forma (setas);

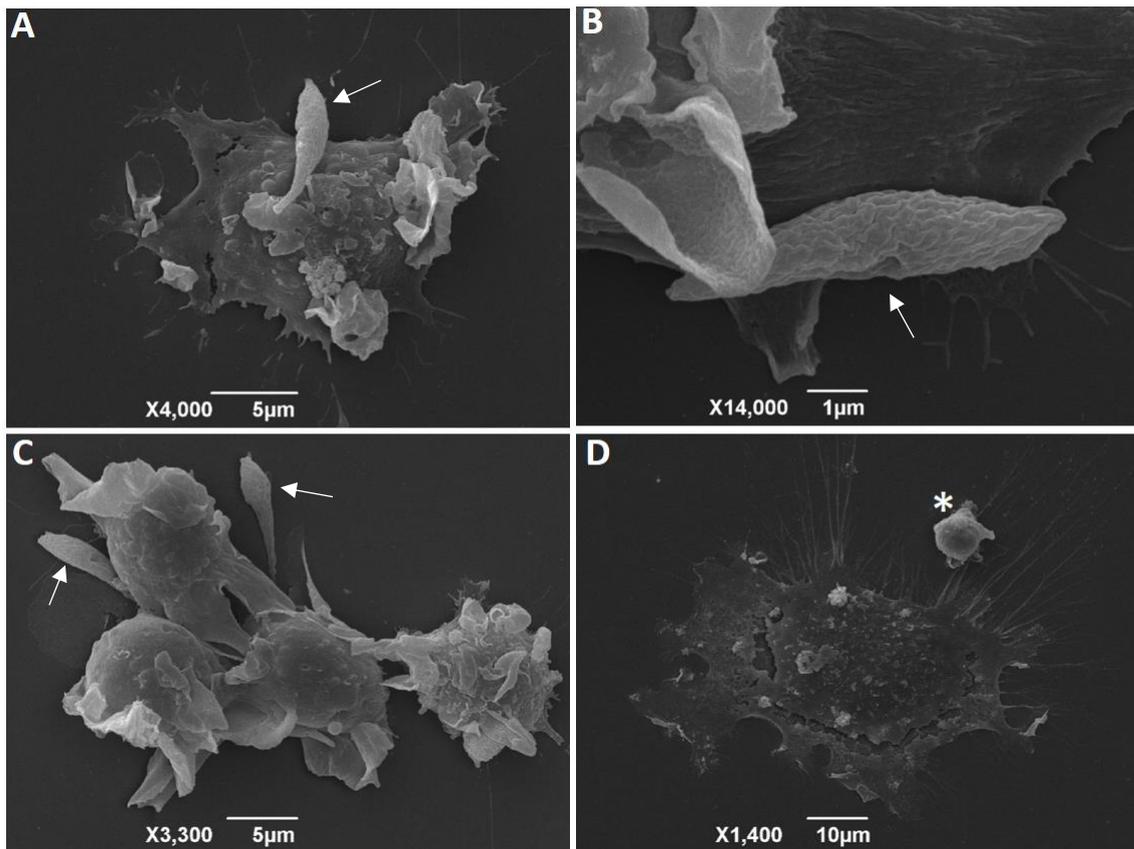


Figura 10: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82, no tempo de 15 minutos na condição com meio suplementado com BSA por MEV. A e C: adesão pela porção anterior do parasito (setas); B: adesão por todo o corpo do parasito (seta); D: amastigota em interação com os prolongamentos da célula (*);

30 minutos de interação (TC-DH82)

Com 30 minutos a interação realizada com meio suplementado com SFB, por MCC, foi possível observar a presença de amastigotas internalizadas (Fig.11 A-D) e amastigotas livres. As células apresentavam-se vacuolizadas (Fig.11 D). Por MEV, foi possível observar a adesão da forma epimastigota aflagelar por todo o corpo e pela porção anterior com a célula (Fig.13 A e B). Foi notado um detalhe da interação parasito-célula, cujas micrografias demonstram a projeção da célula em direção ao parasito (Fig. 13 C e D).

Em relação a condição com BSA, foi observada as mesmas características descritas na interação com SFB, tanto por MCC quanto por MEV como demonstram a Fig. 12. Por MEV, destaca-se nas imagens a interação entre amastigota e célula (Fig.14 A e B) e aglomerados de amastigotas semelhantes a ninhos de parasitos (Fig. 14 C e D).

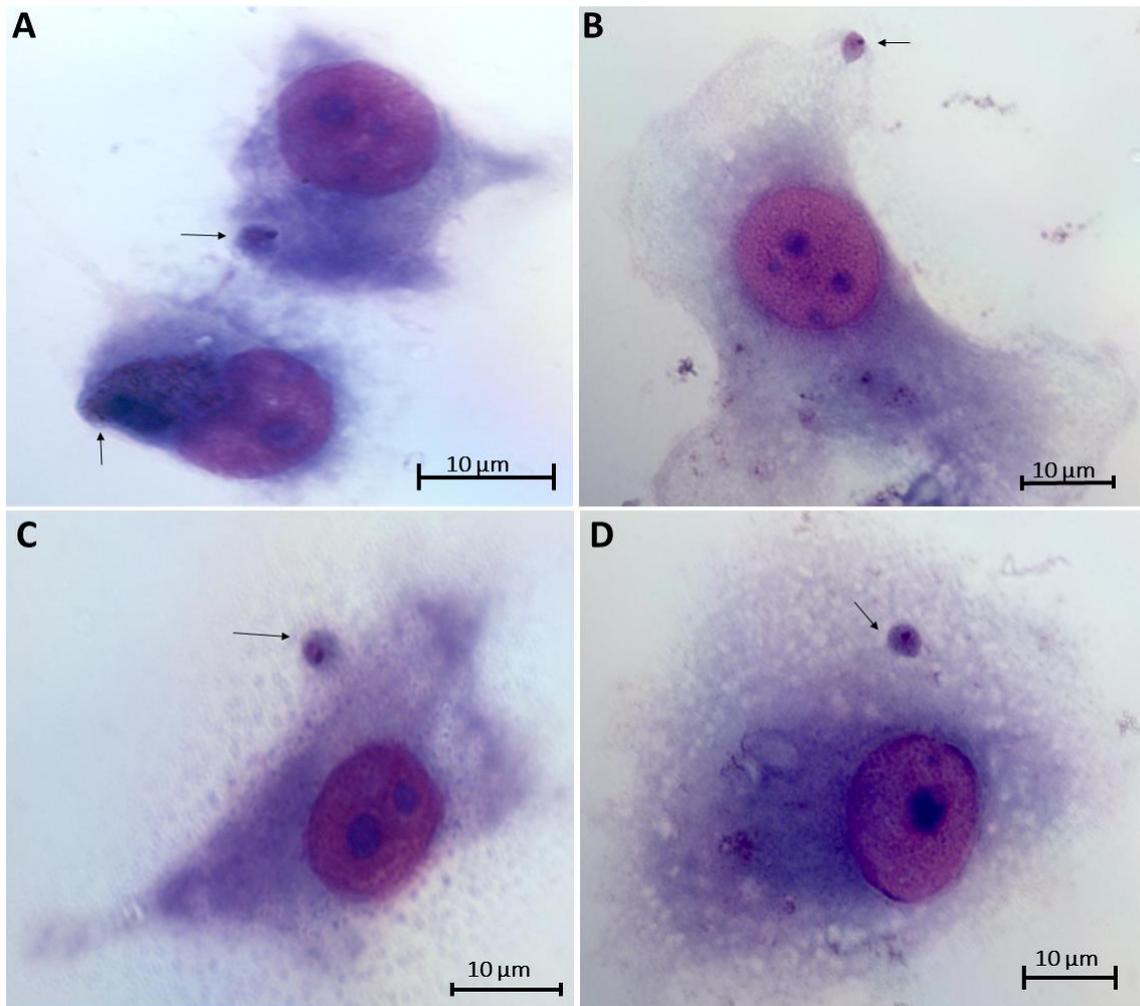


Figura 11 : Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82 no tempo de 30 minutos na condição com meio suplementado SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. Amastigotas interiorizadas (setas);

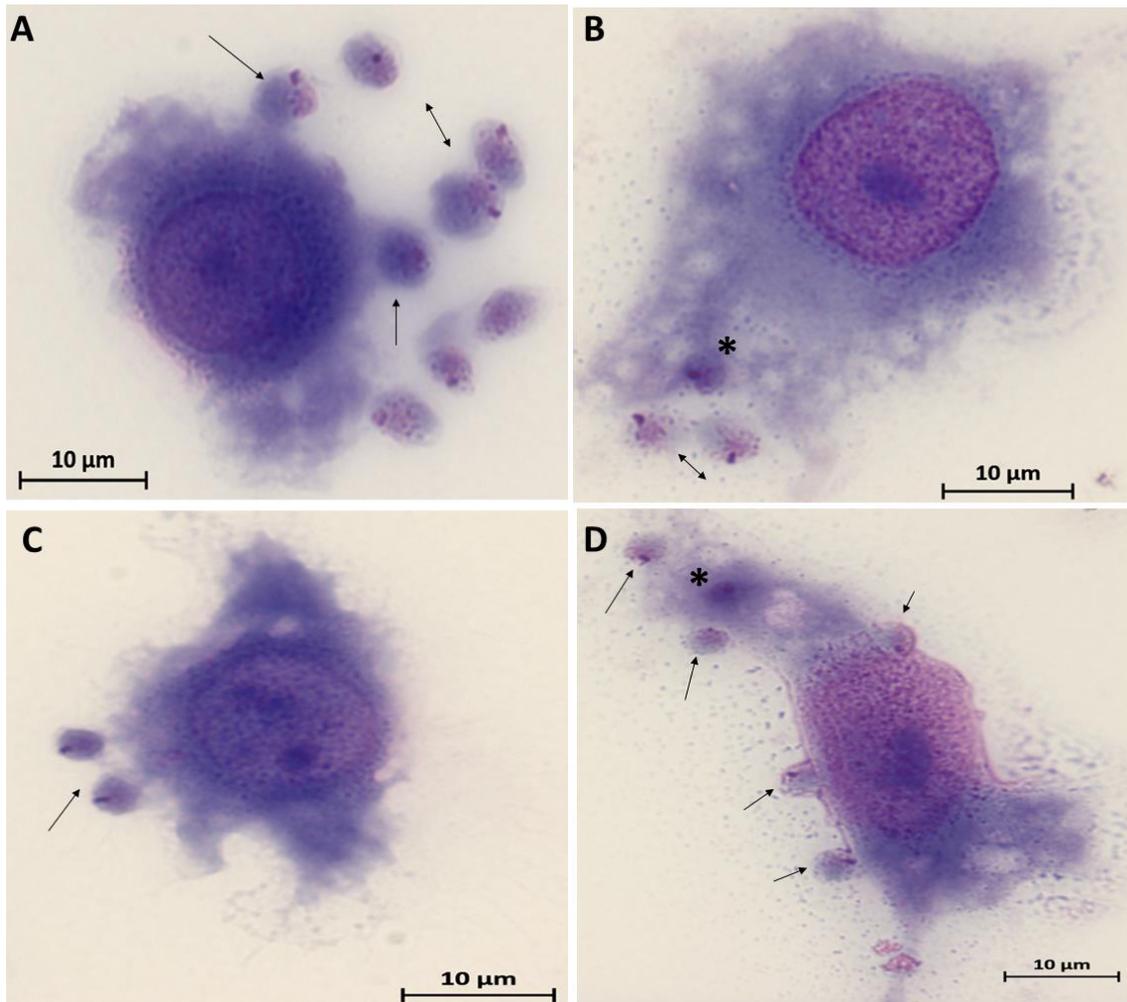


Figura 12: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82, no tempo de 30 minutos na condição com BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. Amastigotas interiorizadas (*), em interação com a célula (seta) e livres (seta dupla);

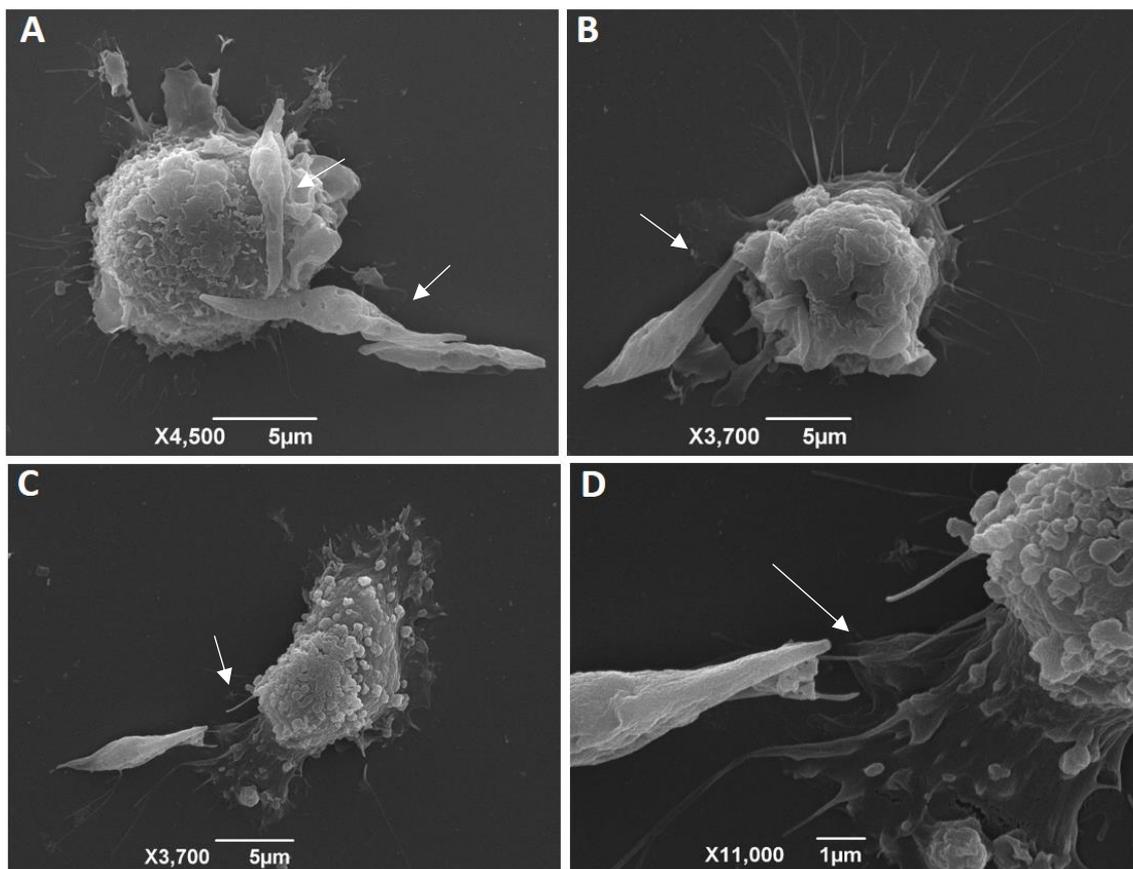


Figura 13: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82 no tempo de 30 minutos na condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: parasitos em mudança de formas e interagindo com a célula; **B:** adesão do parasito pela porção anterior do seu corpo; **C e D:** Detalhe do prolongamento da célula em contato com o parasito (seta);

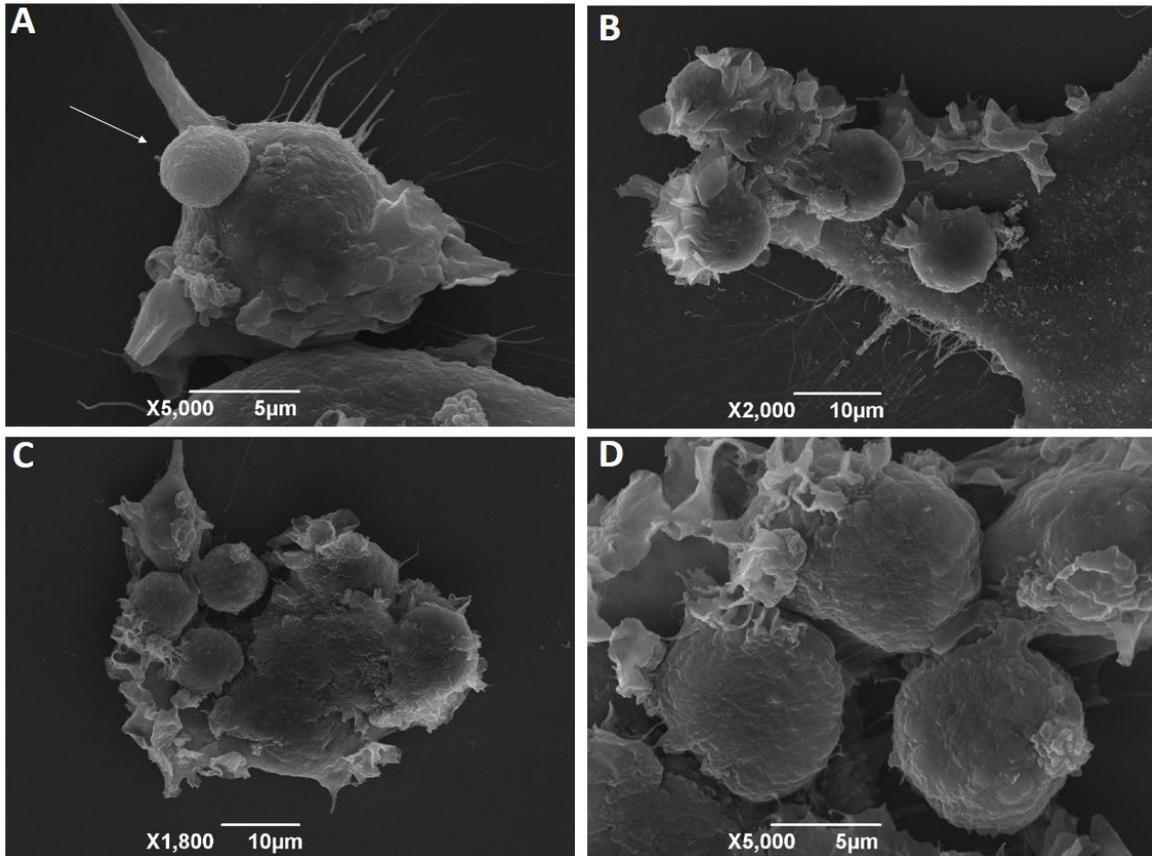


Figura 14: Interação *T. caninum* e linhagem celular DH82 no tempo de 30 minutos na condição com meio suplementado com BSA por MEV entre. A: amastigota em interação com a célula (seta); **B:** aglomerado de amastigotas na célula; **C e D:** detalhe dos aglomerados de amastigotas;

45 minutos de interação – (TC-DH82)

No tempo de 45 minutos, na condição com meio suplementado com SFB, foi observado por MCC formas epimastigota aflagelar livres, próximo à célula e também intensa adesão dessas formas às células (Fig.15 A), parasitos em divisão (Fig.15B e D), amastigotas internalizadas e em interação com a célula (Fig.15 C). Por MEV, foi possível observar um parasito da mudança da forma amastigota para epimastigota aflagelar (Fig.17A) e adesão da forma epimastigota aflagelar à célula (Fig. 17 B).

Com relação à interação na condição com meio suplementado com BSA, também observou - se interação entre amastigota e célula (Fig.16 A – C), amastigotas interiorizadas, e amastigotas livres (Fig.16 D, E e F). Também foi observado parasito em mudança da forma amastigota para epimastigota aflagelar (Fig.16 D e E), amastigota em interação com a célula em diferentes

conformações, arredondada ou ovóide (Fig. 16 A-C e E). É possível notar células vacuolizadas durante essa interação (Fig. 16B e C). Por MEV, foi observado mudança d amastigota para epimastigota aflagelar (Fig.18 A) e amastigotas em interação com a célula em diferentes conformações (Fig. 18 B-D).

Por esse tempo ter apresentado um número menor de parasitos livres e a presença de amastigotas como observado por MCC e MEV, ele foi o primeiro tempo escolhido para ser analisado pela técnica de MET. Nas micrografias de microscopia eletrônica de transmissão, pode ser observada a interação de amastigota com a linhagem celular DH82 (Fig. 19A), detalhe dos prolongamentos projetados da célula e aderidos membrana da forma amastigota do parasito (Fig. 19 B). Amastigotas livres também foram visualizadas (Fig. 19 C e D). Para esse tempo as imagens apresentadas são para a condição com meio suplementado com SFB.

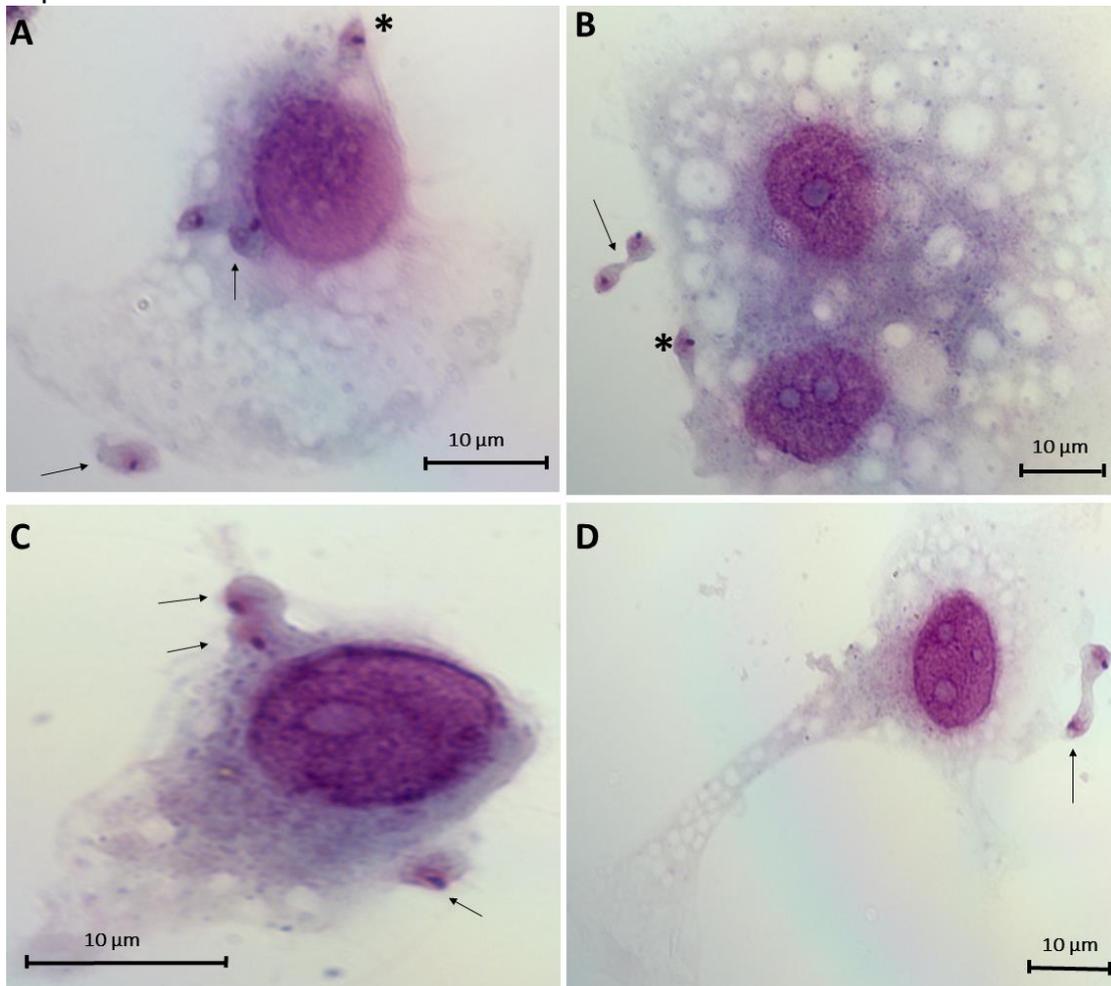


Figura 15: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82 no tempo de 45 minutos em condição com meio suplementado SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: epimastigota aflagelar (EA) aderidos à célula (*), amastigota interiorizada e livre (seta); **B:** adesão de EA (*) e divisão parasitária (seta); **C:** interação entre amastigotas e a célula (seta); **D:** parasito em divisão (seta);

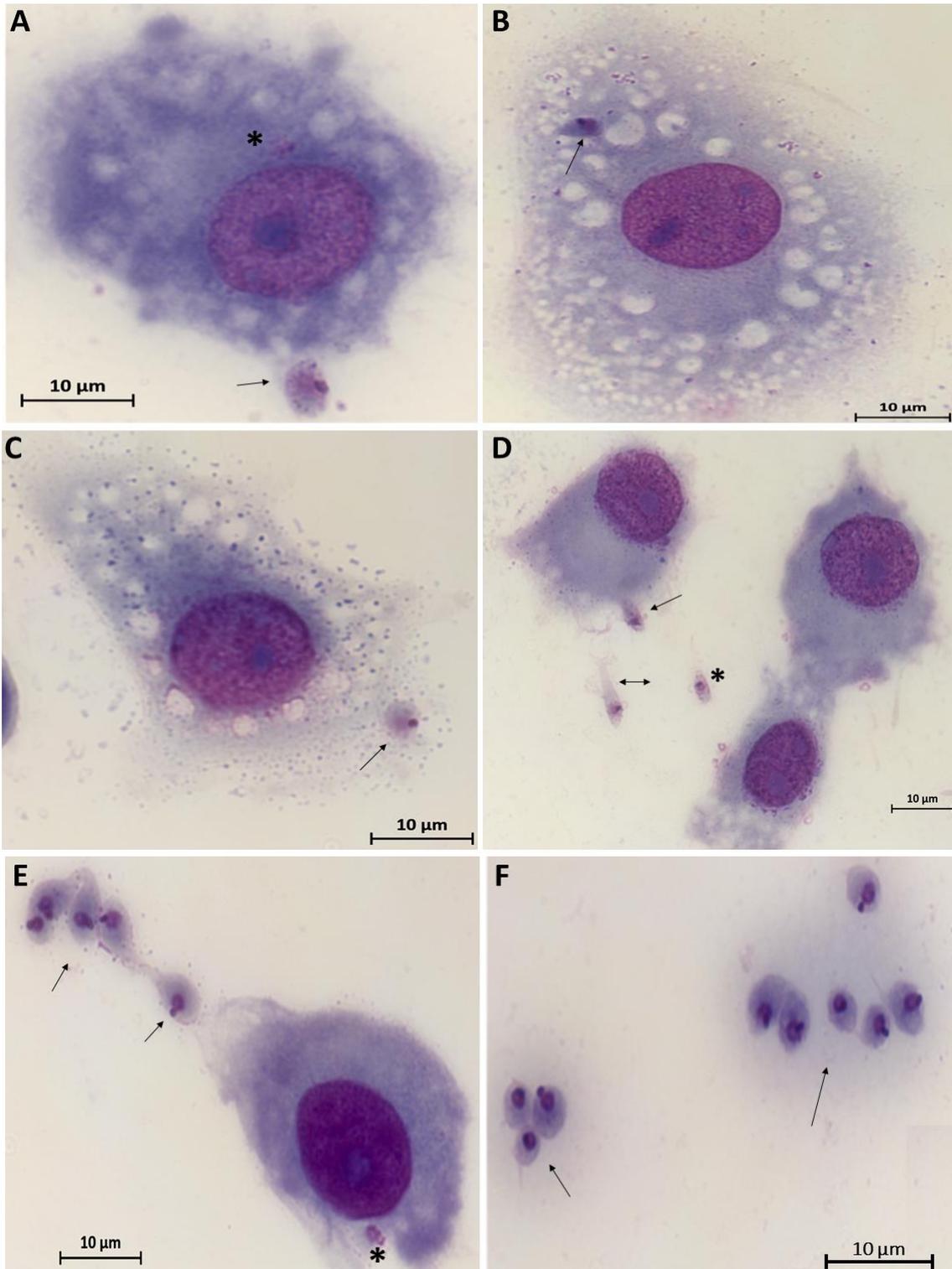


Figura 16: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82, no tempo de 45 minutos na condição com meio suplementado BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: interiorização (*) e interação com a forma amastigota (seta); **B e C:** interação entre amastigota com a célula; **D:** epimastigota aflagelar aderido (seta) e parasito sugestivo de mudança de forma (*) e EA livre (seta dupla); **E:** amastigota interiorizada (*) e em interação com célula e amastigota ovóide sugestivo de mudança de forma; **F:** amastigotas livres;

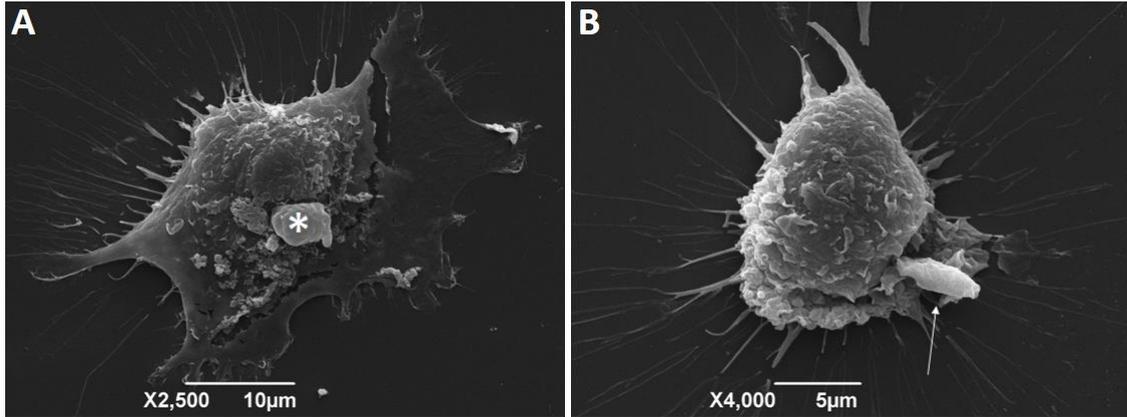


Figura 17: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82, no tempo de 45 minutos na condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: amastigota em mudança para a forma epimastigota aflagelar (EA); B: adesão entre a forma EA com a célula;

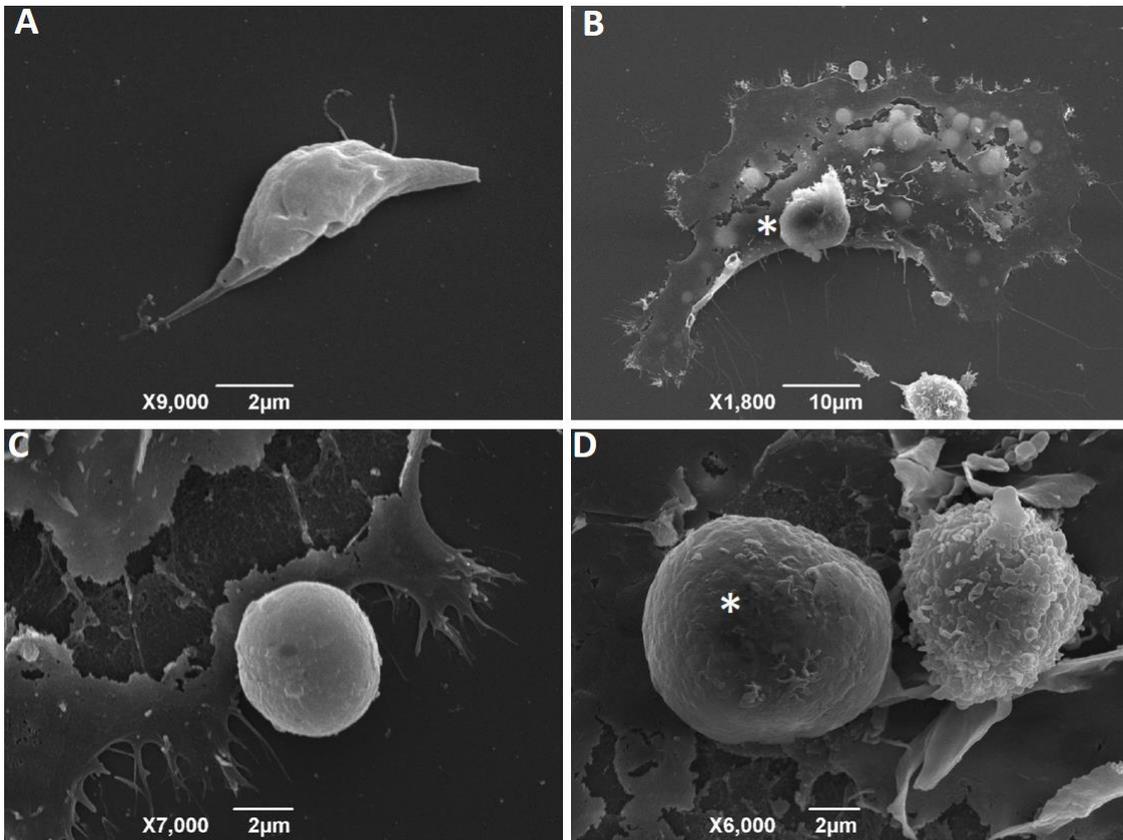


Figura 18: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82, no tempo de 45 minutos na condição com meio suplementado com BSA, por MEV. A: parasito na forma amastigota em mudança para a forma epimastigota; B: amastigota na forma ovoide (*); C: amastigota em contato com célula rompida; D: detalhe da amastigota (*);

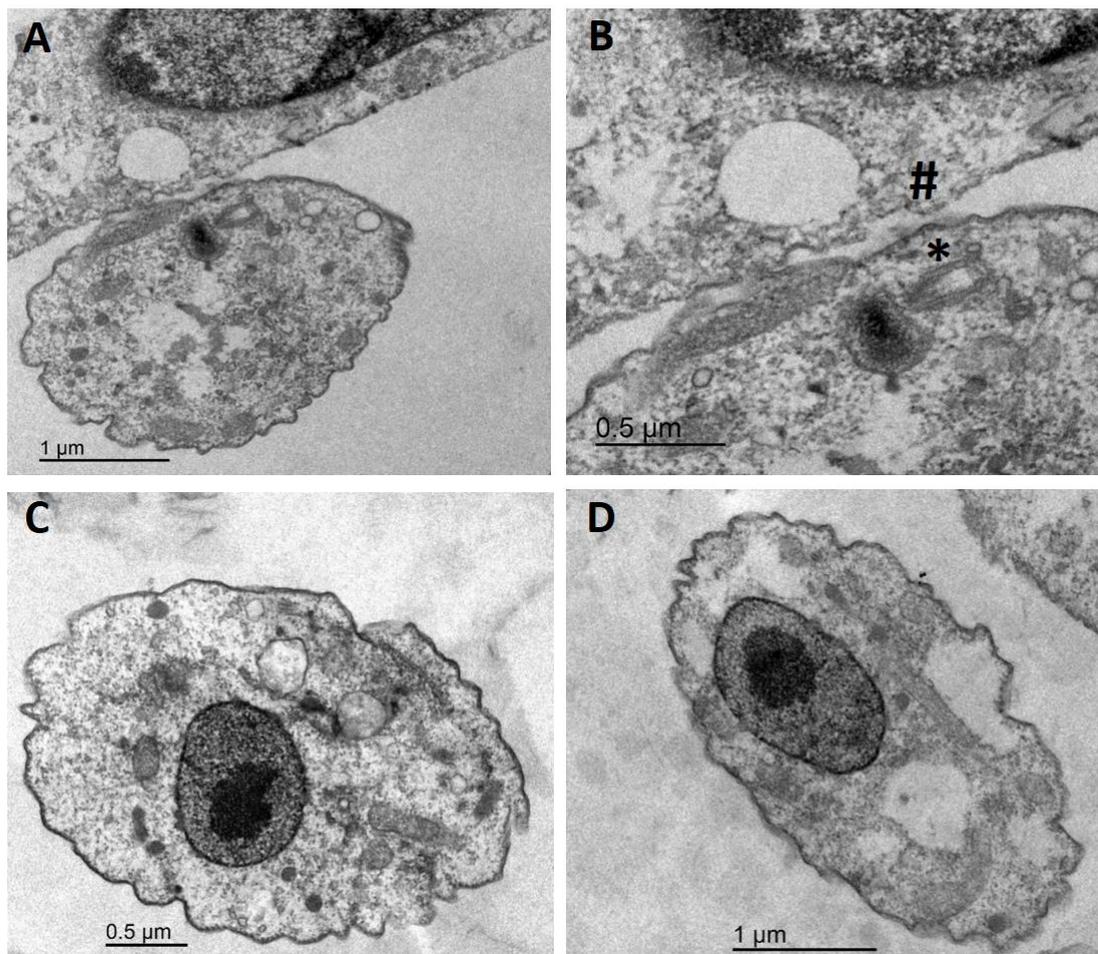


Figura 19: Interação entre *T. caninum* e a linhagem celular DH82 no tempo de 45 minutos por MET. A: interação de amastigota com a célula; **B:** detalhe da interação entre amastigota (*) e célula (#); **C e D:** amastigotas livres;

2 Horas de interação – (TC-DH82)

Em duas horas de interação entre *T. caninum* e a linhagem celular DH82 com meio suplementado com SFB foi observada novamente e agora de maneira mais intensa a ocorrência das formas epimastigotas aflagelares, por MCC (Fig. 20 A e D). Também foi possível observar detalhes da adesão do parasito tanto pela porção posterior como pela anterior do seu corpo à célula (Fig. 20 A, B e D), assim também como a presença de amastigotas. Por MEV, observou-se parasito em mudança de forma amastigota para epimastigota aflagelar (Fig. 21 A) e adesão da forma epimastigota aflagelar à célula (Fig. 21 B).

Na condição utilizando meio suplementado com BSA, foi possível observar a presença de amastigotas internalizadas nas células (Fig. 22 A, E e F), adesão de epimastigota aflagelar (Fig. 22 B e D) e interiorização (Fig. 22A).

Foram notadas células vacuolizadas (Fig. 22 A, B e E). Foi observada interação de muitas amastigotas numa mesma célula (Fig. 22 E e F), essas células se apresentavam alongadas e bastantes vacuolizadas na maioria das vezes. Por MEV, as micrografias demonstram a adesão do parasito à célula (Fig. 23 A), mudança da forma amastigota para epimastigota aflagelar (Fig 23 B e C) e da interação entre amastigota e célula (Fig 23 D).

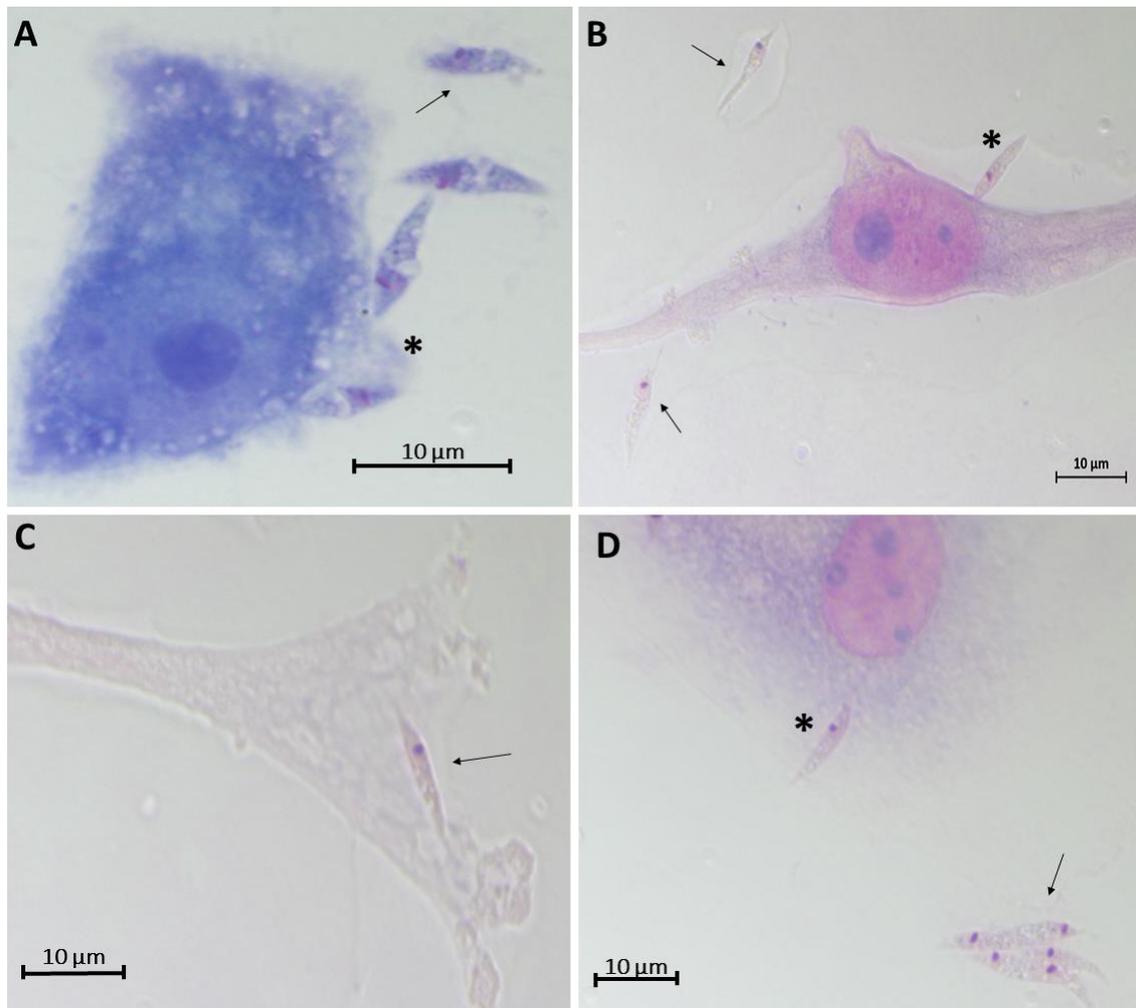


Figura 20: Interação entre *T. caninum* e a linhagem DH82 no tempo de 2 horas na condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A, B e D: Epimastigota aflagelar (EA) aderidos (*) e livres (seta), C: Forma EA aderida (*) à célula com todo o corpo;

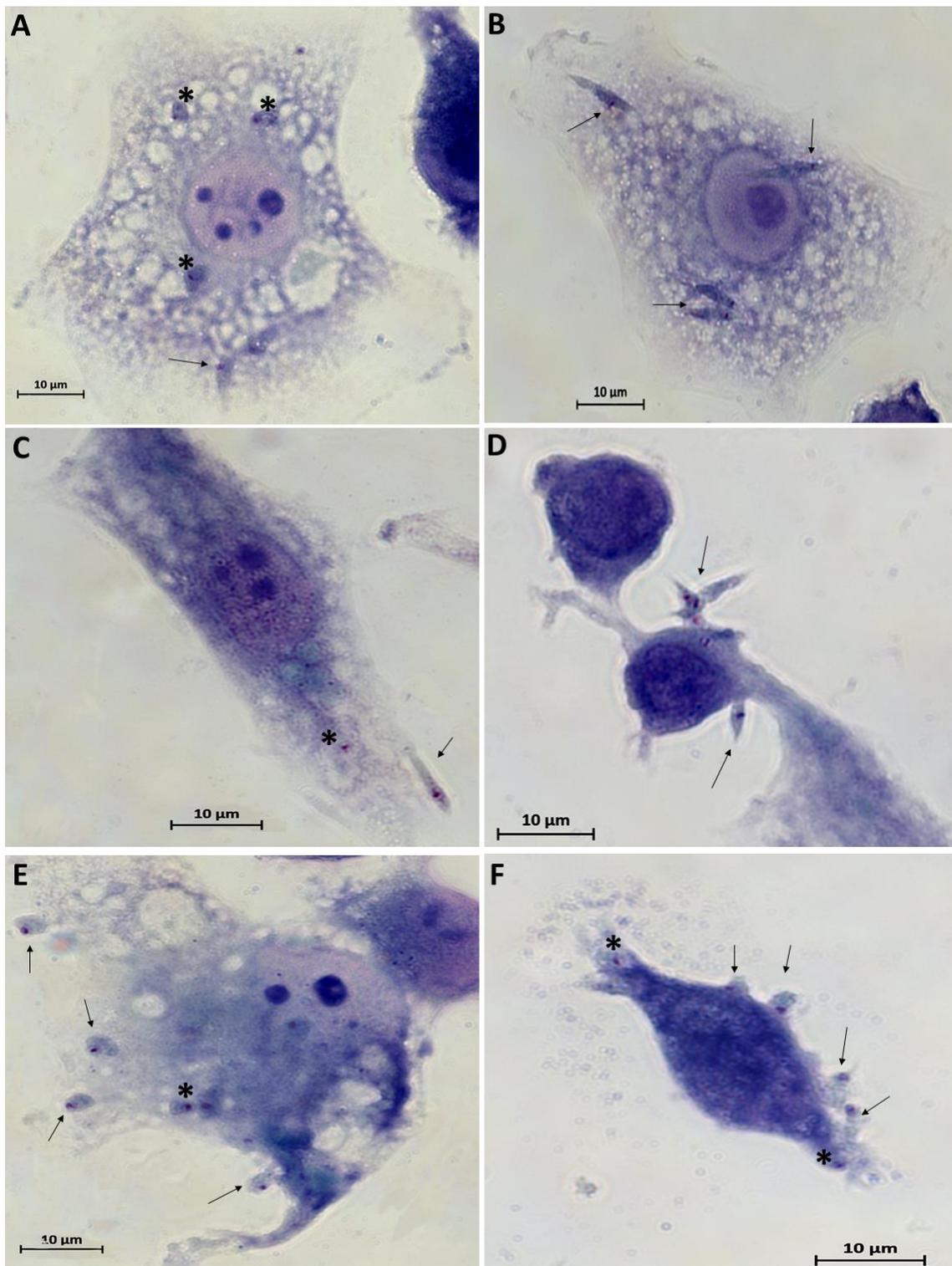


Figura 21: Interação entre *T. caninum* com a linhagem DH82 no tempo de 2 horas na condição com meio suplementado com BSA, por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: amastigota (*) e epimastigota aflagelar (EA) (seta) interiorizado; B e D: adesão de EA à célula (setas); C: adesão de EA à célula e amastigota interiorizadas; E e G: amastigotas interiorizadas e em interação com a célula; F: EA livre e amastigota interiorizada; G: interação entre amastigotas e célula;

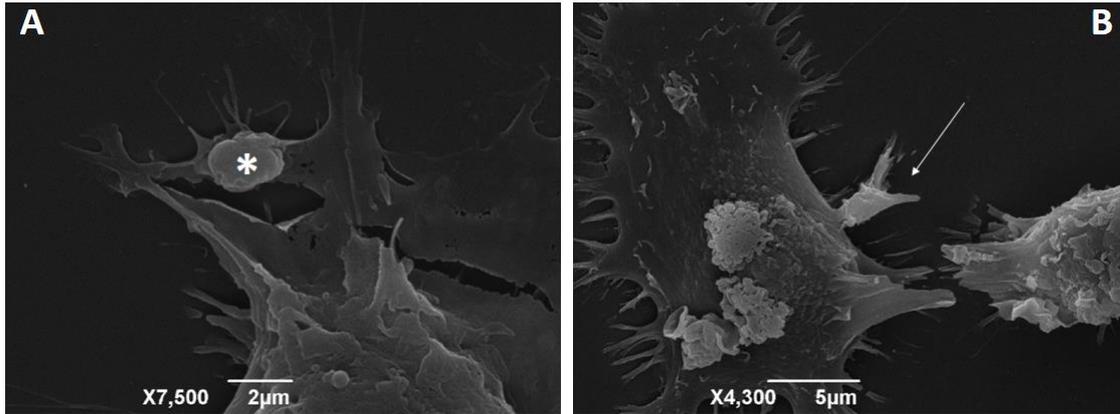


Figura 22: Interação entre *T. caninum* e a linhagem celular DH82 no tempo de 2 horas na condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: interação de amastigota na forma ovoide (*); B: adesão do parasito na célula;

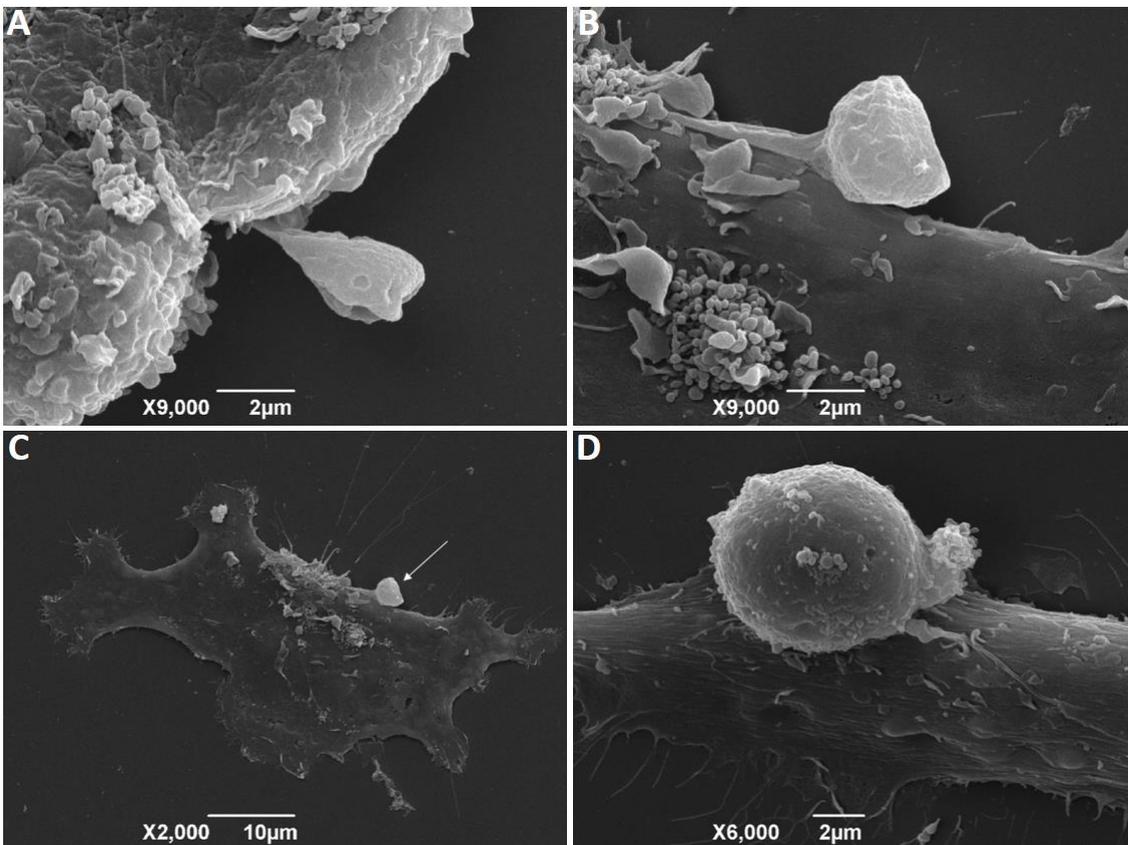


Figura 23: Interação no tempo de 2 horas na condição com BSA pela técnica de MEV. A: adesão do parasito; B: mudança de forma do parasito da forma amastigota para epimastigota aflagelar; C: célula com amastigota interagindo com a membrana da célula; D: detalhe da amastigota em contato com a célula;

6 horas de interação – (TC-DH82)

Nessa etapa da interação, na condição com meio suplementado com SFB foram observadas amastigotas interiorizadas e em interação com a célula (fig. 24 A e D). Foi observada pela micrografia, imagem sugestiva de divisão de amastigota dentro do vacúolo parasitóforo como representado na figura 24C. Foi possível observar por esse tempo também a adesão da forma epimastigota aflagelar com a célula (Fig. 24 B). Pela técnica de MEV, as micrografias demonstram adesão de da forma epimastigota aflagelar à célula (Fig. 26 A) e parasito em mudança da forma evolutiva de amastigota para epimastigota aflagelar (Fig. 26 B). Por MET, as micrografias eletrônicas demonstram amastigota íntegra no interior de vacúolo parasitóforo (Fig. 28 B) e também decomposição de amastigotas dentro da célula (Fig. 28 A), amastigotas interagindo com as células (Fig. 28 C e D).

Na condição com meio suplementado com BSA, foi notado que havia muitas epimastigotas aflagelares aderidas e próxima as células (Fig. 25 A-D), amastigotas interiorizadas em células íntegras e em células vacuolizadas e com citoplasma fragmentado (Fig. 25 A, C e D). Foi identificada a interação entre as células pelos prolongamentos celulares (Fig. 25 B). Por MEV, foi possível observar adesão da forma epimastigota aflagelar (Fig 27 A e B), aglomerados de amastigotas interagindo com a célula (Fig 27 C), detalhe da interação da célula com amastigota, com projeções da célula em contato com a amastigota (Fig. 27 D). Por MET foi observado amastigotas livres (Fig. 29 A - C) e interiorizadas (Fig. 29 D).

Este foi o segundo tempo escolhido para análise por MET devido elevada presença da forma amastigota de *T. caninum*.

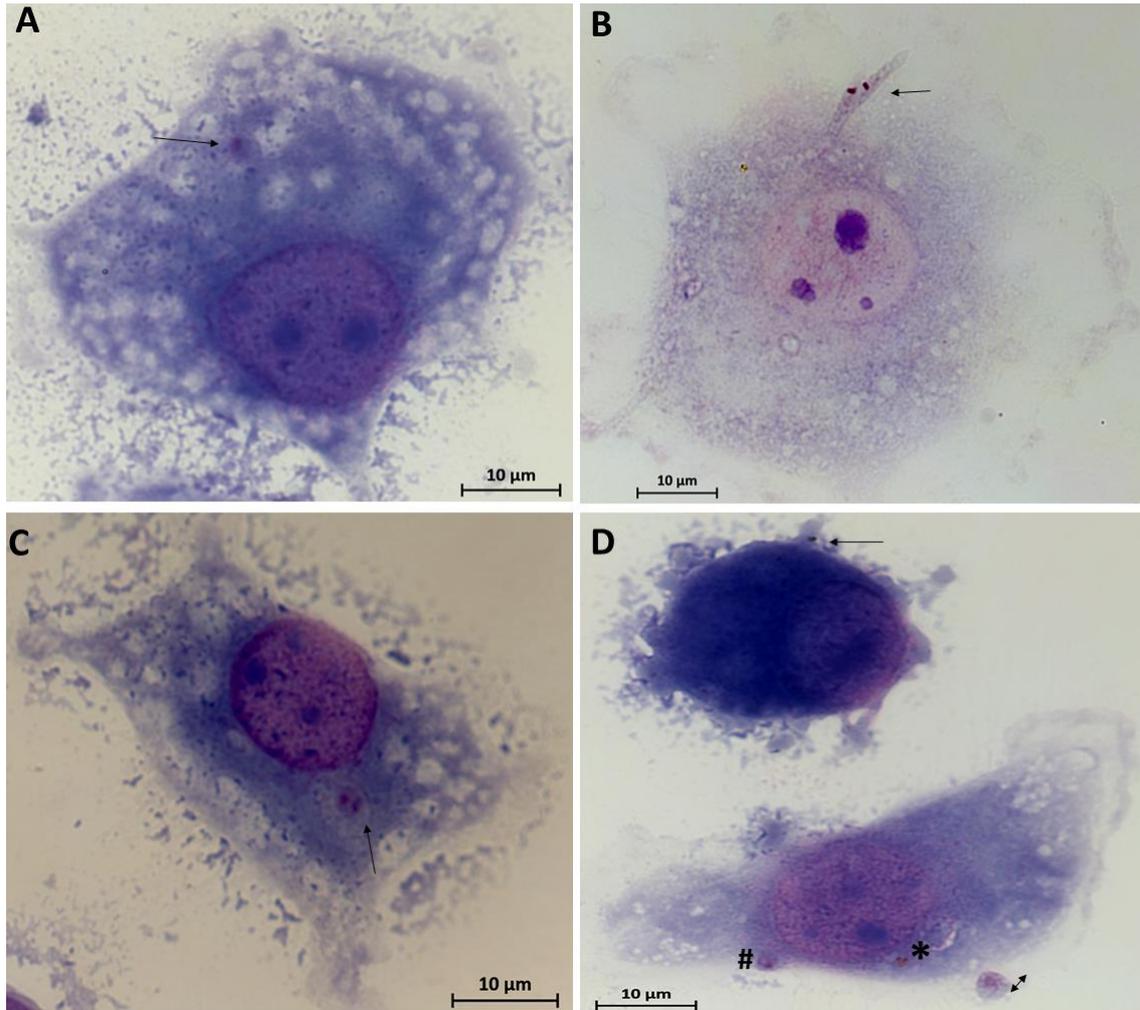


Figura 24: Interação entre *T. caninum* e linhagem DH82 no tempo de 6 horas na condição com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: amastigota interiorizada; **B:** adesão de epimastigota aflagelar (EA); **C:** divisão de amastigota no interior do vacúolo parasitóforo; **D:** adesão de EA (seta) e interação (#), interiorização de amastigotas (*) e amastigotas livres (seta dupla);

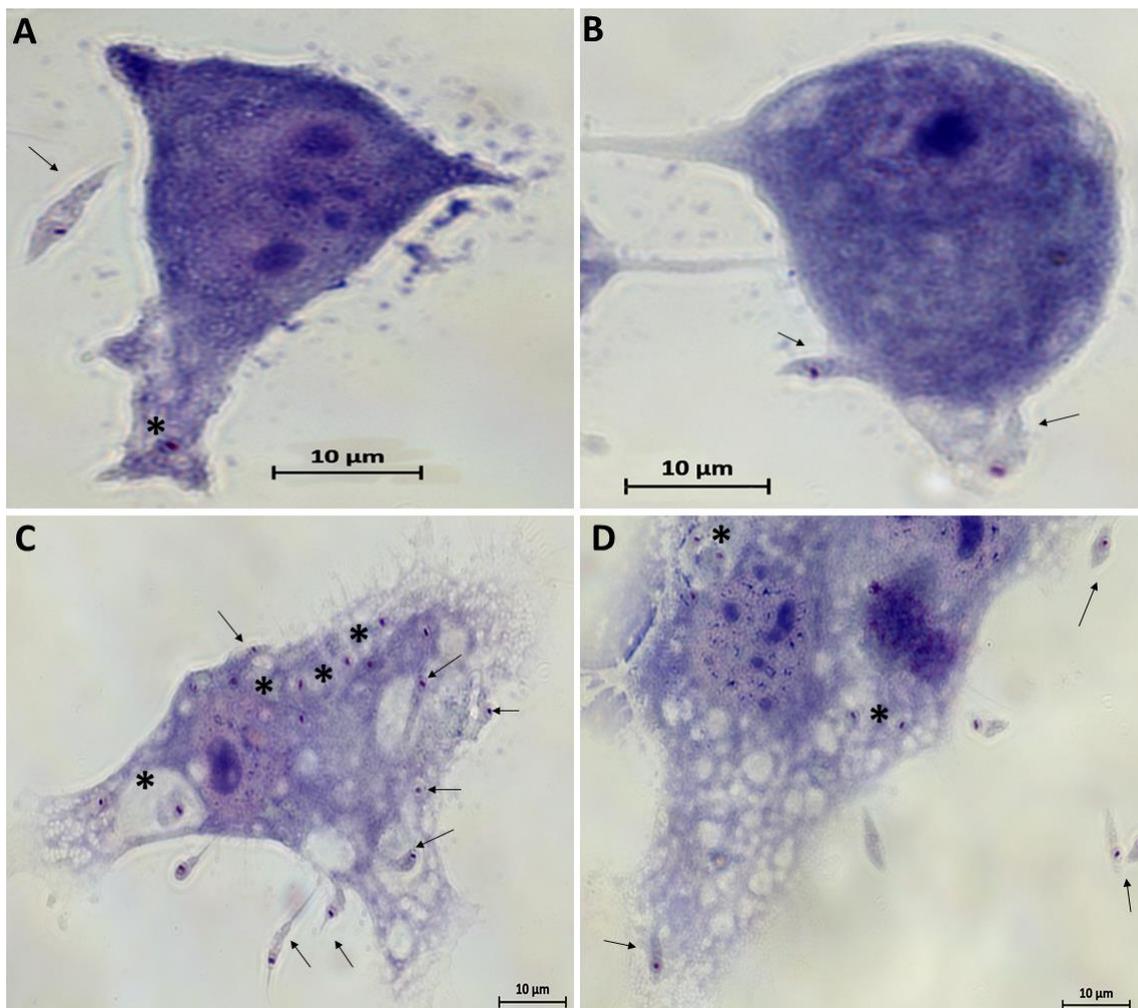


Figura 26: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82, no tempo de 6 horas na condição com meio suplementado BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: epimastigota aflagelar (EA) livre (seta) e amastigota interiorizada (*); **B:** adesão de EA; **C:** interiorização de amastigotas em vacúolos (*) e adesão de EA (seta) **D:** parasitos livres (seta) e interiorizados (*);

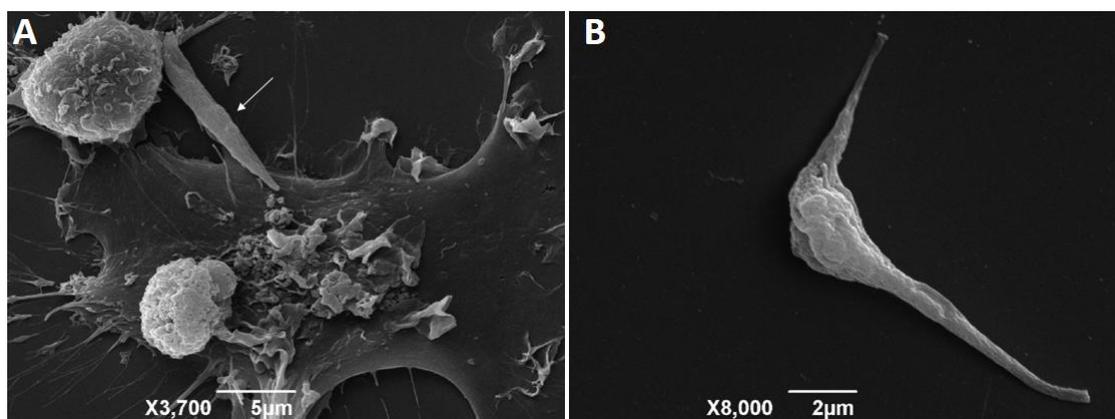


Figura 25: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82 no tempo de 6 horas na condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: parasito na forma aflagelar aderido pela parte anterior na célula (seta); **B:** parasito da forma amastigota em mudança para a forma epimastigota;

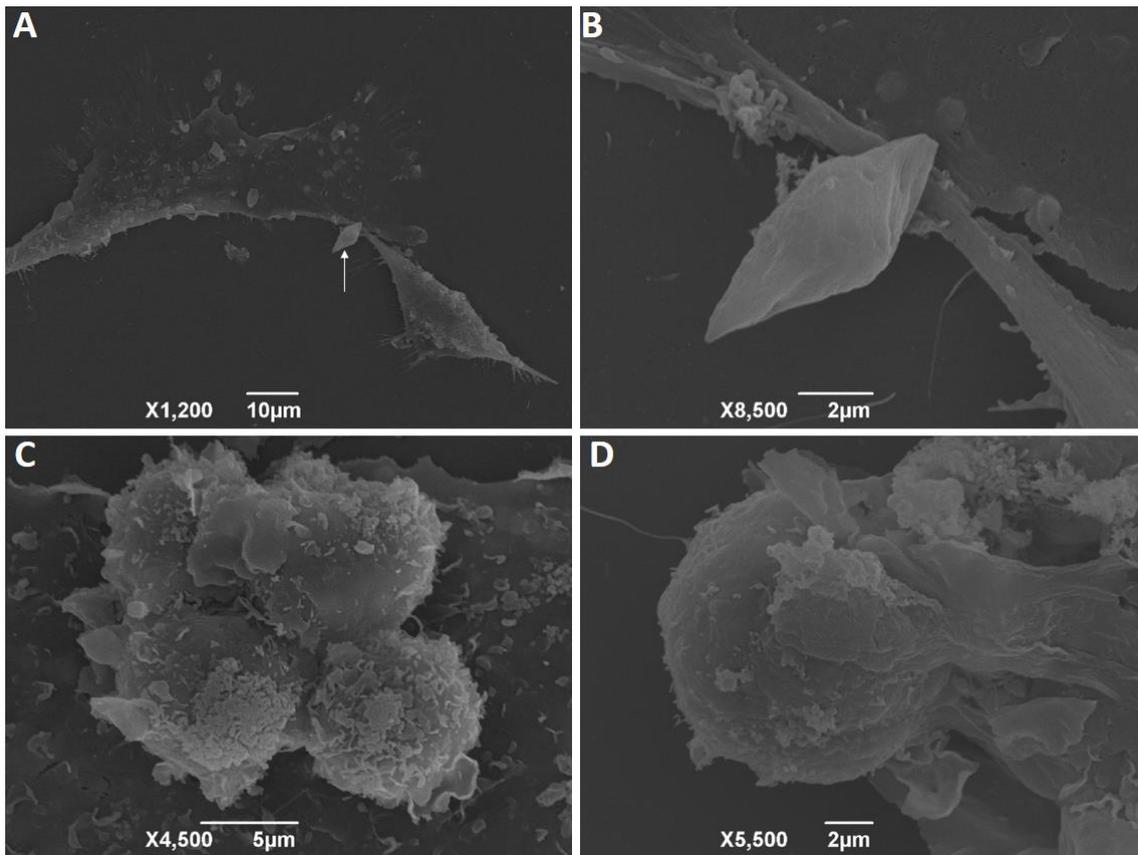


Figura 27: Interação entre *T. caninum* e linhagem celular DH82 no tempo de 6 horas na condição com meio suplementado com BSA por MEV. A e B: adesão do parasito na forma epimastigota aflagelar (seta); C: aglomerados de amastigota; D: detalhe da amastigota em interação com a célula;

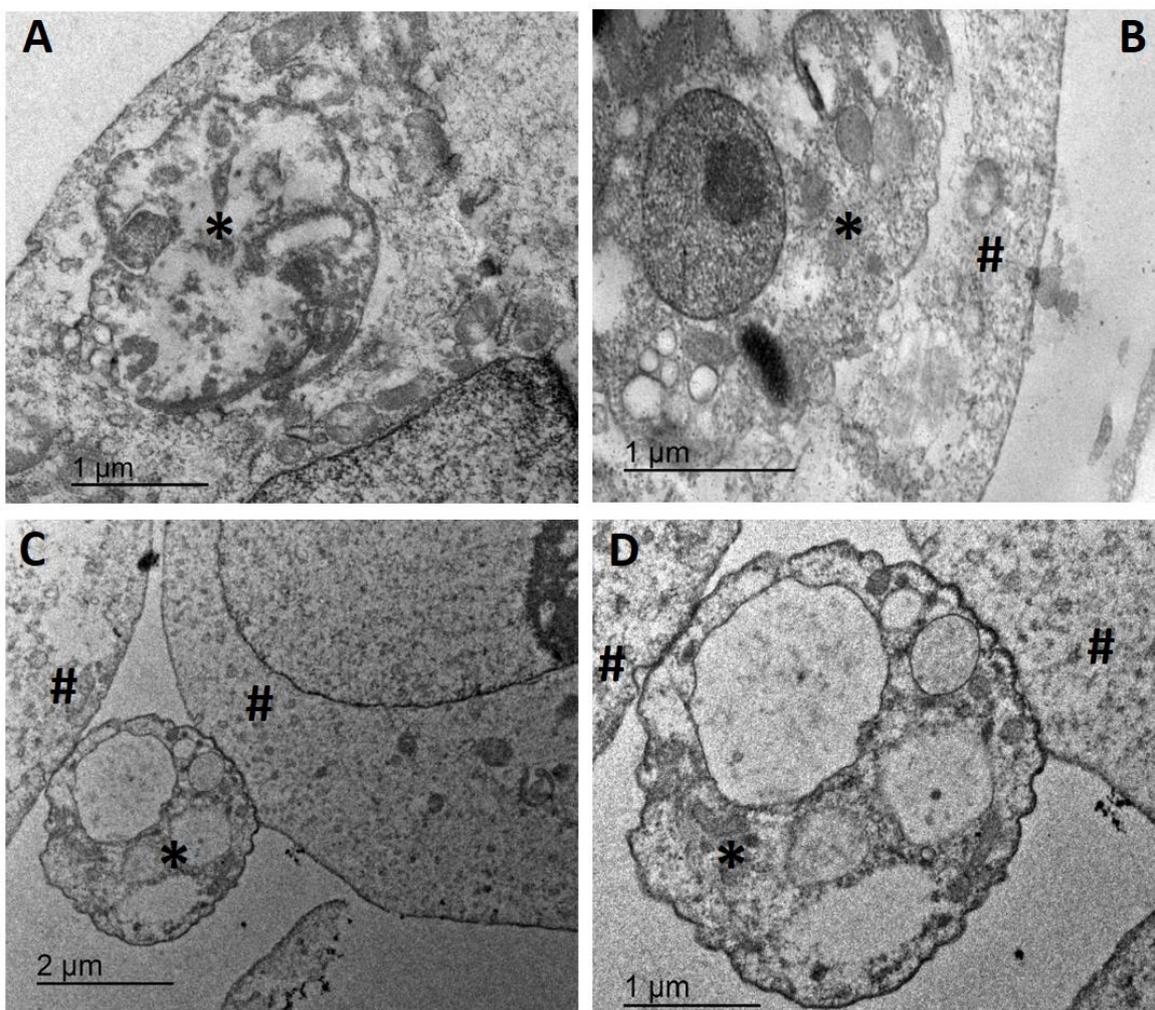


Figura 28: Interação entre *T. caninum* e linhagem DH82 no tempo de 6 horas na condição com meio suplementado com SFB por MET. A: amastigota em decomposição (*); B: amastigota interiorizada (*); C: interação entre amastigota (*) e células (#); D: detalhe da interação entre amastigota (*) e duas células (#);

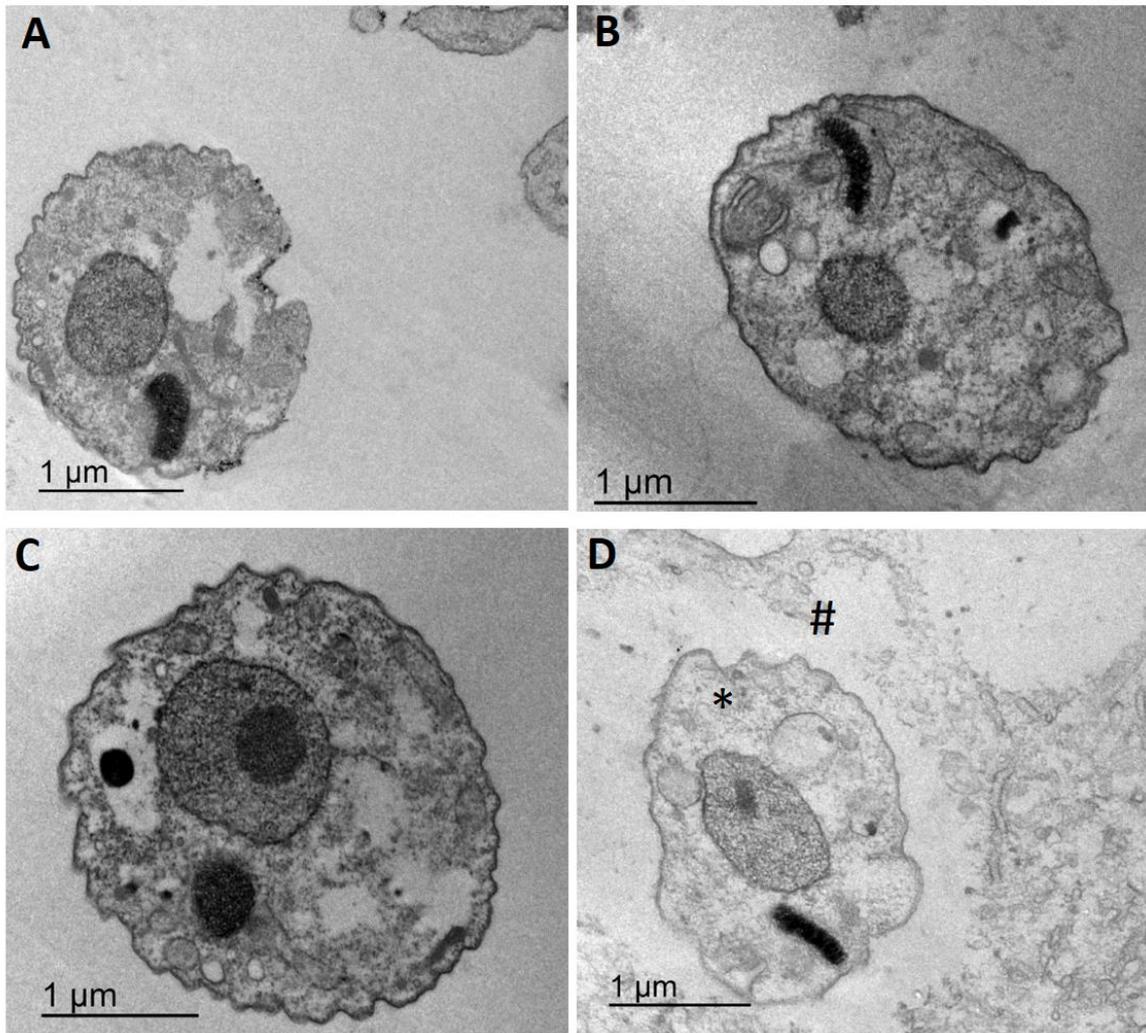


Figura 29: Interação entre *T. caninum* e linhagem DH82, no tempo de 6 horas na condição com meio suplementado com BSA por MET. A, B e C: amastigotas livres; D: amastigota (*) interiorizada na célula (#);

24 horas de interação – (TC-DH82)

Nesse tempo pela técnica de MCC, na condição com meio suplementado com SFB, foram observadas muitas células dispostas ao longo da lamínula e células vacuolizadas com amastigotas interiorizadas (Fig. 30 A, B, C e E), interação entre a forma amastigota com a DH82 (Fig. 30 D). Por MEV, foram capturadas imagens demonstrando a adesão entre a forma epimastigota aflagelar e a célula (Fig. 32 A) e amastigotas livres próximas as células (Fig. 32 B, C e D). A técnica de MET permitiu mostrar parasitos livres, próximo a célula (Fig. 34 A, C e D) e células com bastantes vacúolos (Fig. 34 B).

Na condição com meio suplementado com BSA foram observados os mesmos eventos do que visto com SFB, interação com a forma amastigota e a célula (Fig. 31 A, C, D e F) e amastigotas livres (Fig. 31 D e F). Foi percebida maior presença de formas amastigotas do que epimastigotas aflagelares. Por MEV, foi observada a adesão de epimastigota aflagelar à célula (Fig. 33 A e E), parasitos em mudanças de forma amastigota para epimastigota aflagelar (Fig. 33 B-E) e aglomerados de amastigotas em interação com a célula aparentemente destruída, com ruptura (Fig. 33 F-H). A técnica de MET permitiu observado parasitos livres (Fig. 35 A), amastigotas endocitadas, com detalhe do flagelo (Fig. 35 B e C), célula com vacúolos abundantes (Fig. 35 D), como na condição com SFB. Notou-se amastigota endocitada e em sua proximidade vários vacúolos (Fig. 35 E), em detalhe amastigota interiorizada (Fig. 35 F).

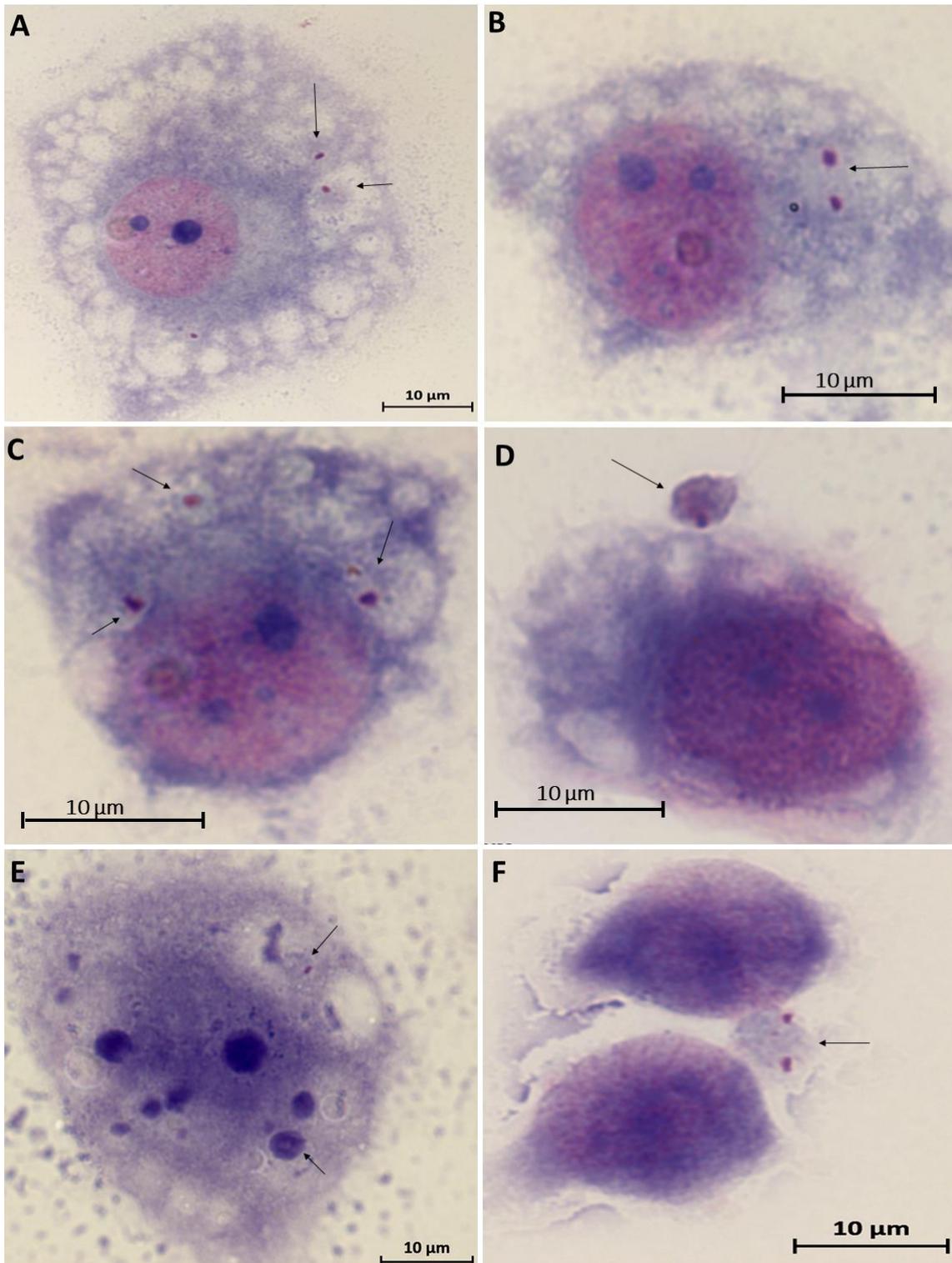


Figura 30: Interação entre *T. caninum* e a linhagem celular DH82 no tempo de 24 horas na condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: amastigota interiorizada (seta); **B:** Divisão de amastigota no interior do vacúolo parasitóforo (seta); **C e E:** várias amastigotas interiorizadas (setas); **D:** interação de amastigota com a célula (seta); **F:** divisão do parasito fora da célula (seta);

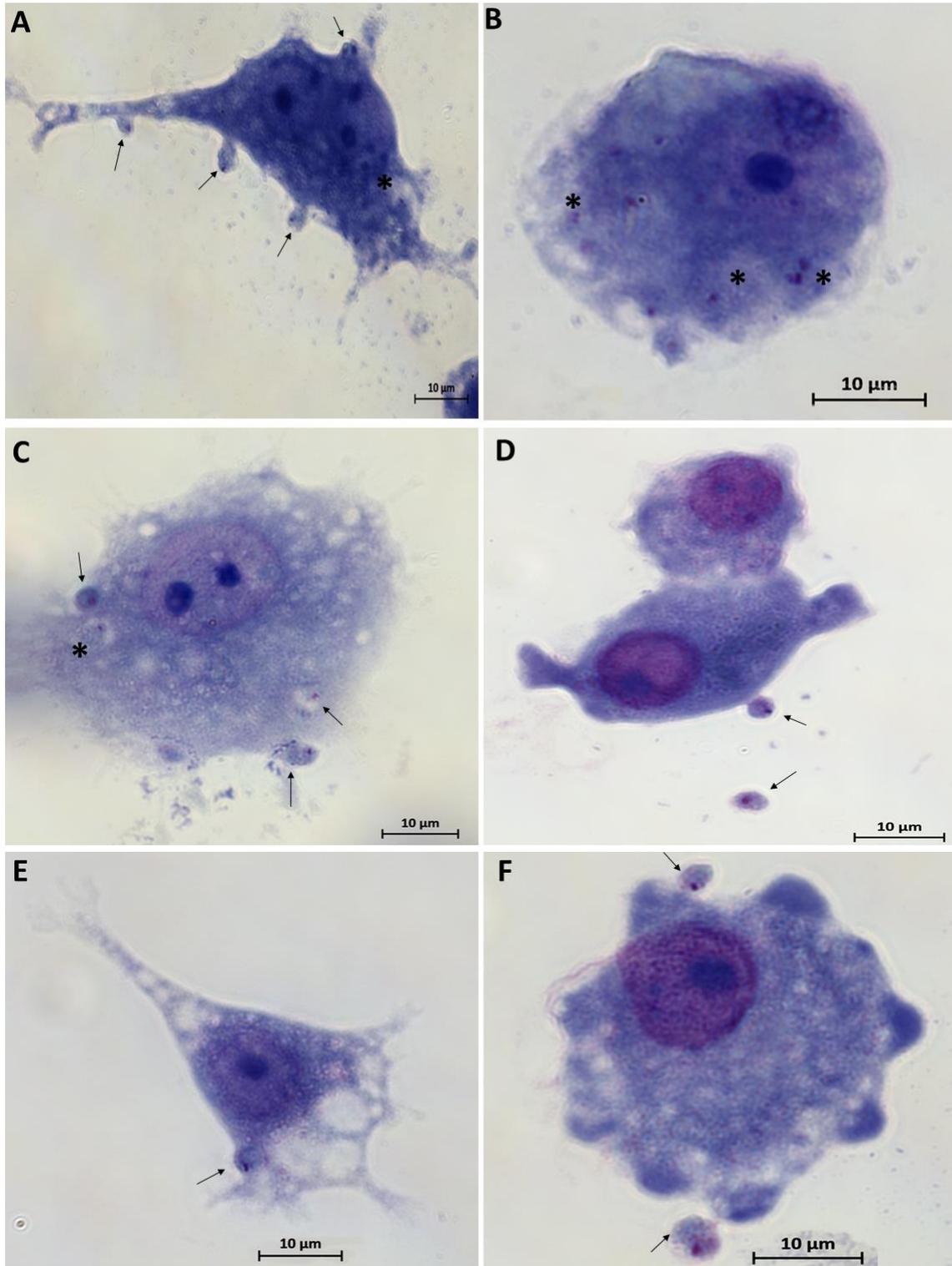


Figura 31: Interação entre *T. caninum* e a linhagem celular DH82, no tempo de 24 horas na condição com meio suplementado com BSA por de MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: várias amastigotas interagindo com a célula (seta) e amastigota interiorizada (*); **B:** amastigotas interiorizadas; **C:** interiorização (*) e interação (seta) de amastigotas; **D-F:** interação de amastigotas;

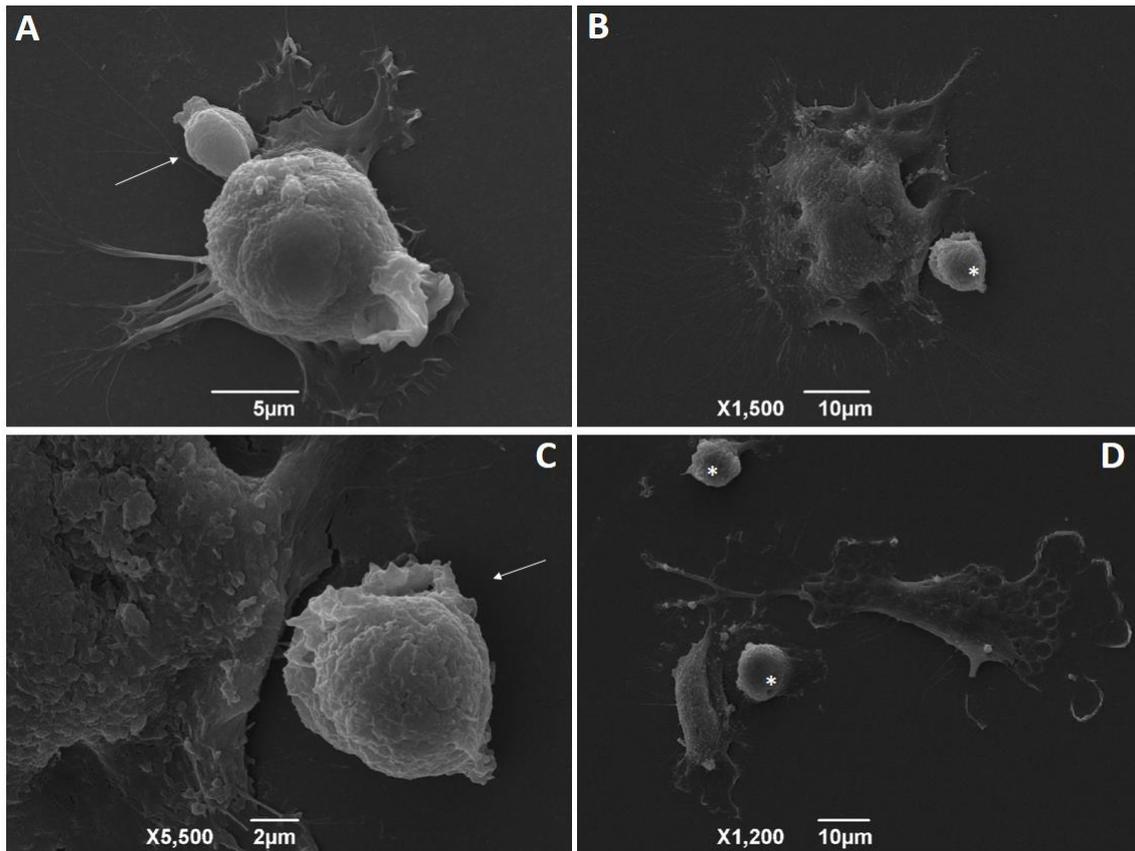


Figura 32: Interação entre *T. caninum* e a linhagem celular DH82 no tempo de 24 horas na condição com meio suplementado SFB por MEV. A: adesão do parasito na forma epimastigota aflagelar (seta); **B:** forma amastigota ao lado da célula (*); **C e D:** amastigotas livres (seta) e (*);

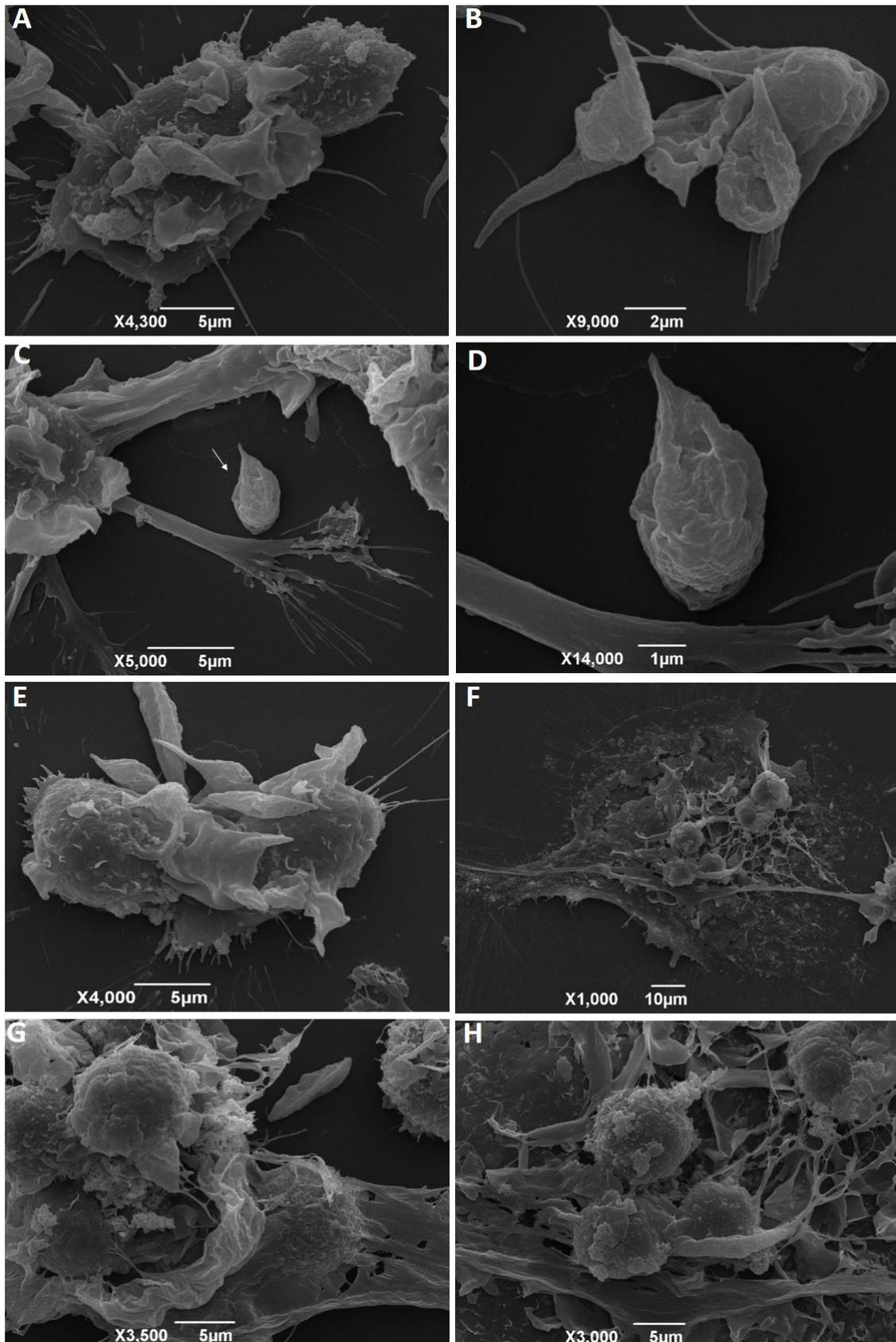


Figura 33: Interação entre *T. caninum* e a linhagem celular DH82 no tempo de 24 horas na condição com meio suplementado com BSA por MEV. A: adesão do parasito na forma epimastigota aflagelar (EA); B e C: parasitos em mudança das formas amastigotas para EA (seta); D: detalhe do parasito mudando a forma amastigota para EA; E: adesão de EA; F, G e H: aglomerados de amastigotas;

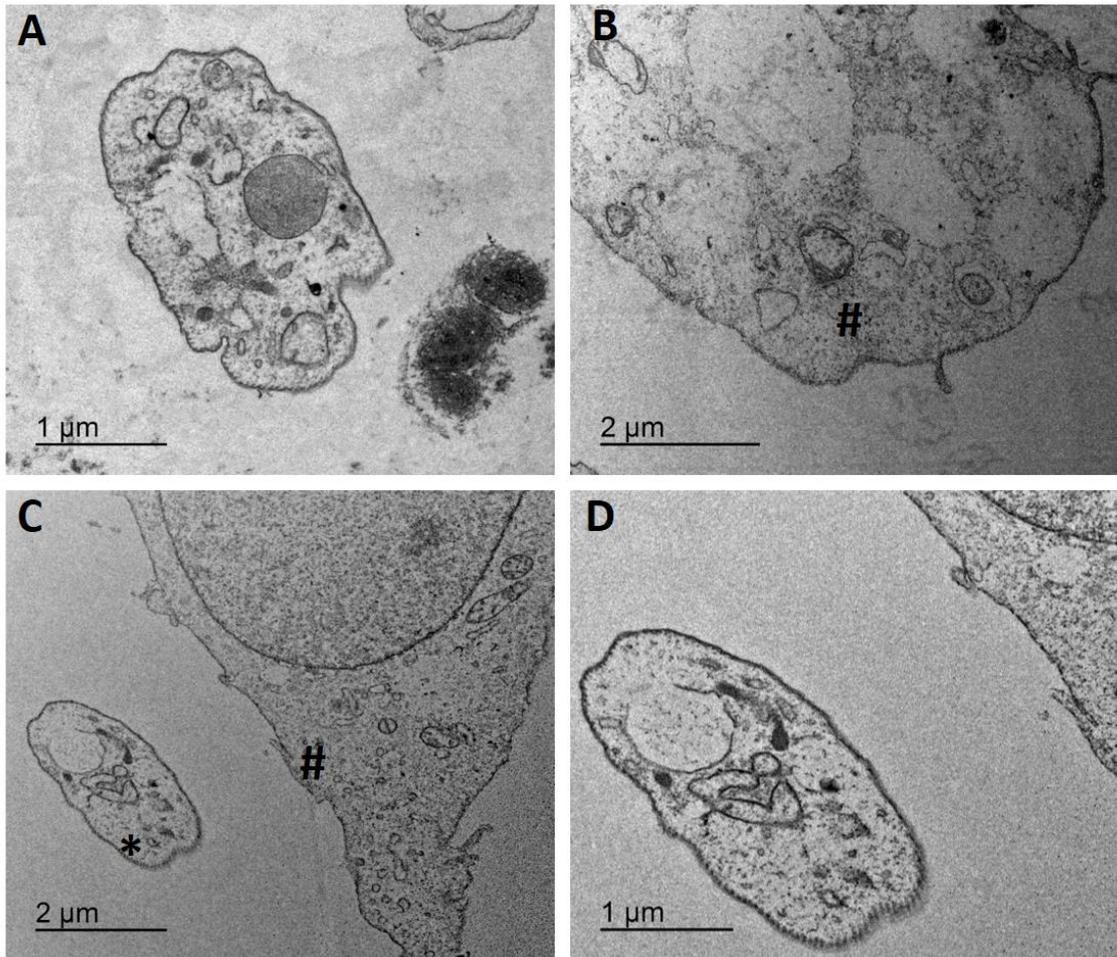


Figura 34: Interação entre *T. caninum* e a linhagem celular DH82 no tempo de 24 horas na condição com meio suplementado com SFB por MET. A: amastigota livre; B: célula em degeneração com muitos vacúolos; C: parasito livre (*) ao lado da célula (#); D: detalhe do parasito livre próximo a célula;

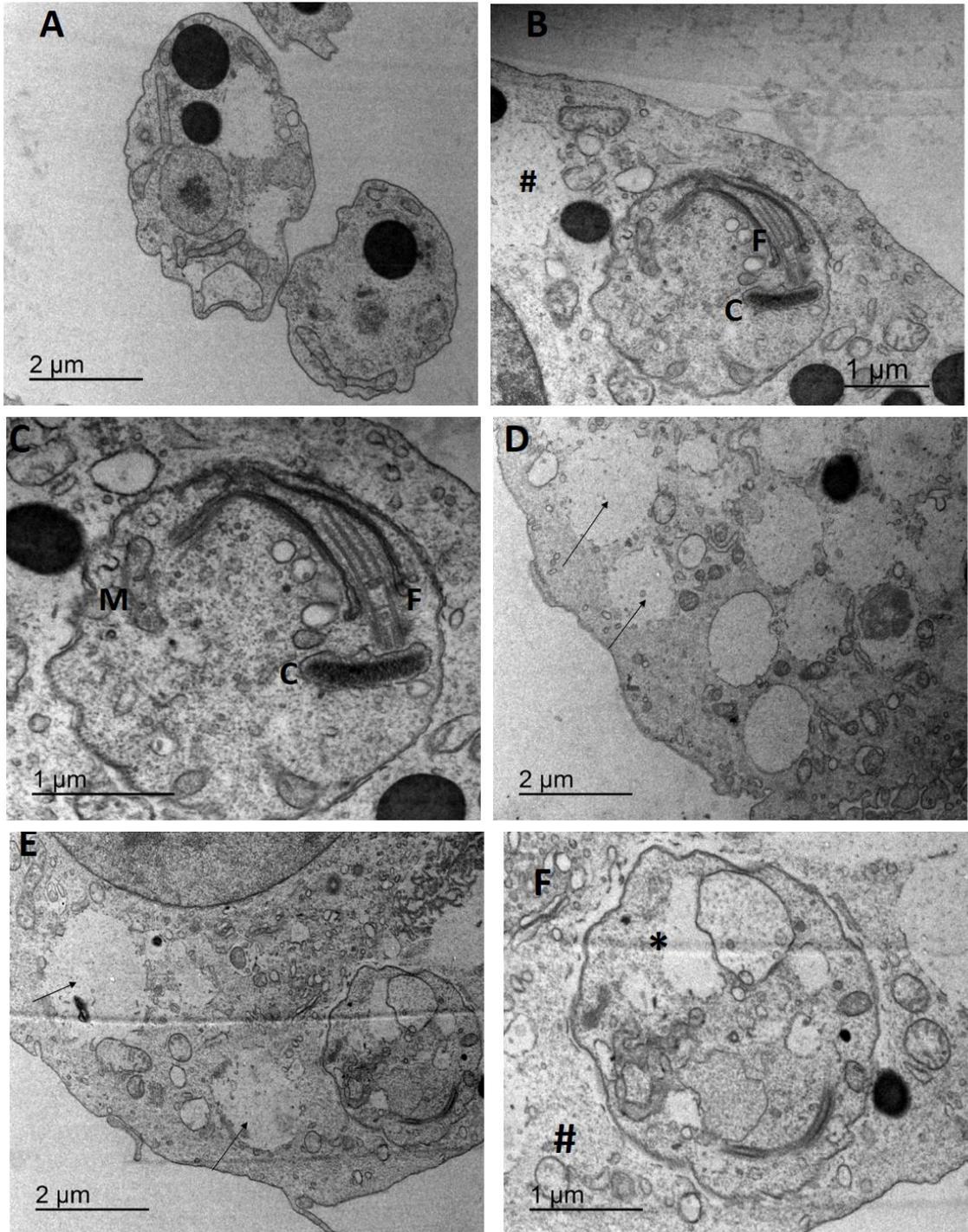


Figura 35: Interação entre *T. caninum* e a linhagem celular DH82 no tempo de 24 horas na condição com meio suplementado com BSA por MET. A: parasitos livres; B: amastigota interiorizada evidenciando o cinetoplasto (C) e o flagelo (FL); C: detalhe da amastigota interiorizada, cinetoplasto (C), flagelo (FL) e mitocôndria (M); D: célula, com inúmeros vacúolos vazios em degeneração; E: célula com vários vacúolos e com amastigota interiorizada; F: detalhe da amastigota interiorizada;

48 horas de interação – (TC-DH82)

No último tempo de interação, por MCC, na condição com meio suplementado com SFB foram observadas muitas células distribuídas pela lamínula com parasitos livres situados entre as células e nas bordas das lamínulas. Foram visualizadas numerosas células com parasitos na forma amastigota interiorizados e em interação com a célula com bastante frequência (Fig. 36 A-D), aglomerados de amastigotas aparentemente se dispersando das células (Fig. 36 E e F). A técnica de MEV demonstrou através de micrografias, parasito em mudança de forma amastigota para epimastigota aflagelar (Fig. 38 A e C), amastigotas interagindo com a célula em diferentes conformações, indicando mudança de forma (Fig. 38 B e D).

Com meio suplementado com BSA, foram observadas características semelhantes em relação a interação com SFB: células com amastigotas interiorizadas (Fig. 37 B e C), interação com amastigota e parasitos livres nas formas amastigotas, e transição da forma amastigota para aflagelar. (Fig. 37 A, D e F). No entanto não havia tantas células distribuídas pelas lamínulas como na condição com SFB. Por MEV, foi visualizado interação entre a forma de amastigota *T. caninum* e a célula (Fig. 39 A e B), adesão de epimastigota aflagelar com a célula (Fig. 39 C e F), detalhe da amastigota com conformação atípica, indicando possível mudança de forma iminente (Fig. 39 E e G), além da formação de aglomerados de amastigotas (Fig. 39 H).

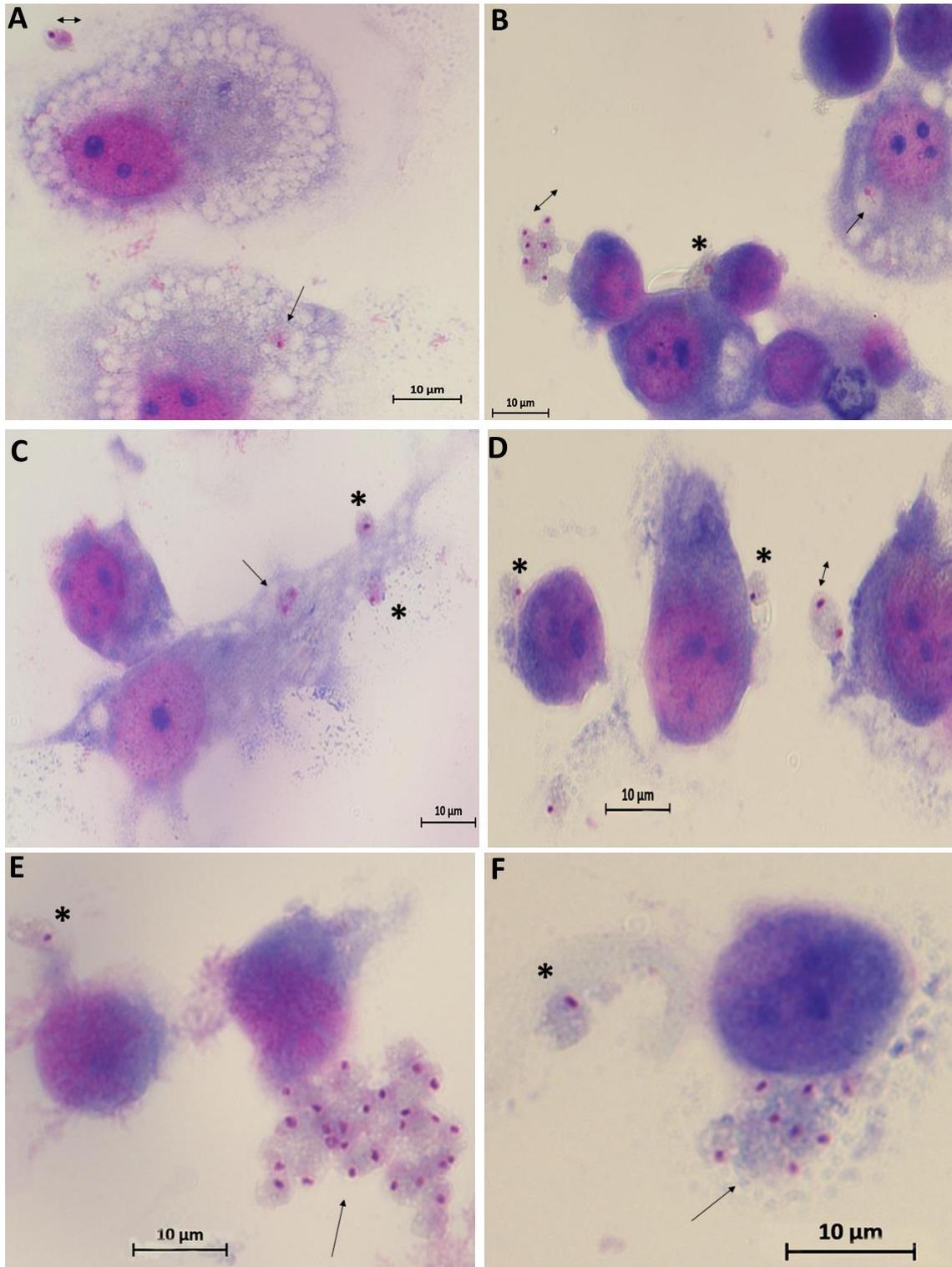


Figura 36: Interação entre *T. caninum* e linhagem DH82, no tempo de 48 horas na condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A e C: amastigotas interiorizadas (seta) e livre (seta dupla); B e D: amastigotas em interação (*) e livres (seta dupla); E e F: aglomerados de amastigotas próximo à célula (seta) e amastigotas em interação com fragmentos da célula (*);

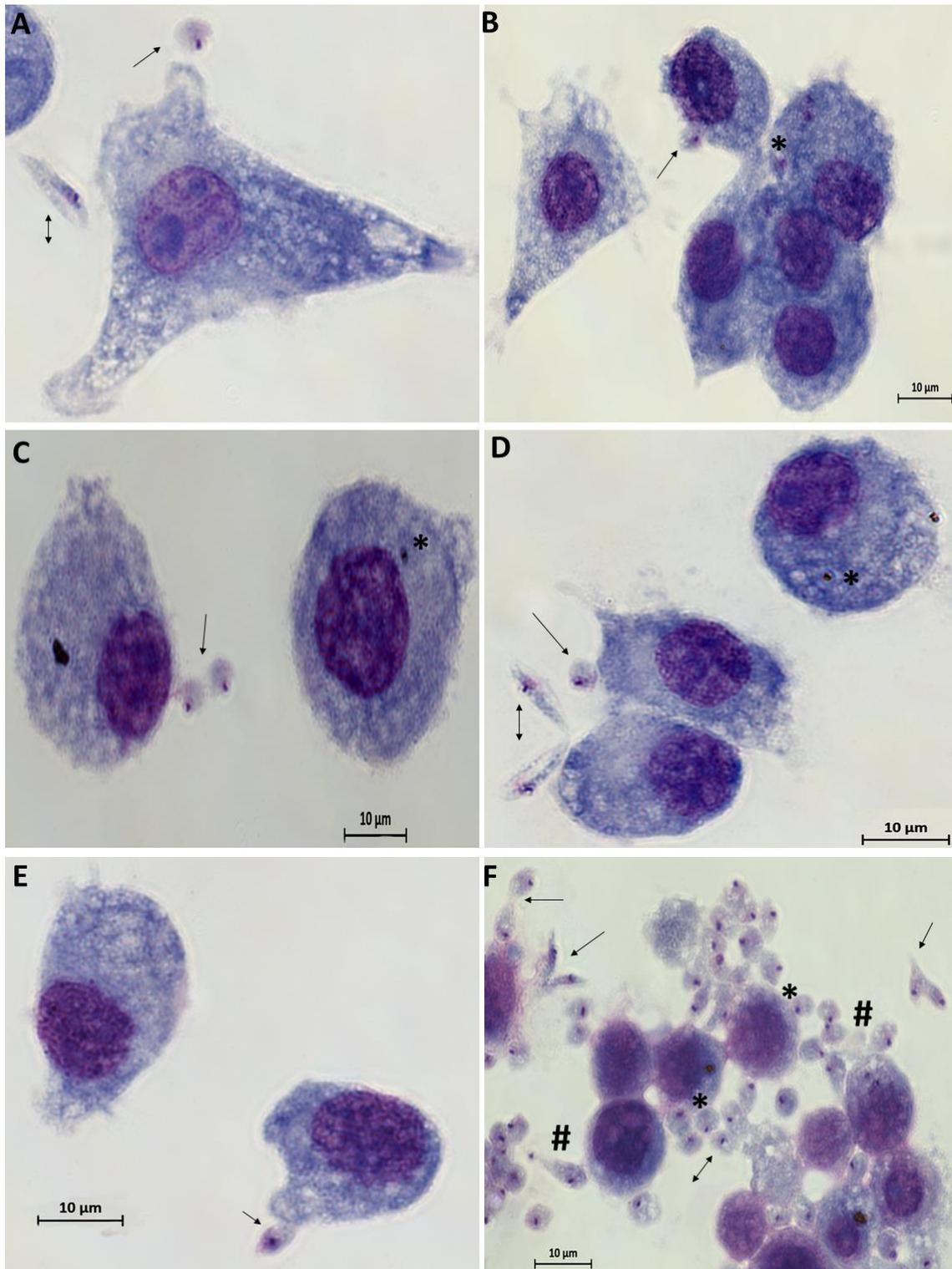


Figura 37: Interação entre *T. caninum* e linhagem DH82, no tempo de 48 horas na condição com meio suplementado com BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: amastigota (seta) e epimastigota aflagelar (EA) (seta dupla) livres; **B e C:** interação (seta) e interiorização de amastigotas (*); **D:** interação (seta) e interiorização de amastigota com a célula (*) e EA (seta dupla) próximo a célula; **E:** detalhe da interação entre amastigota e célula; **F:** amastigotas em interação com a célula (*), em mudança da forma amastigota para EA(#) e formas EA livres e em divisão (seta);

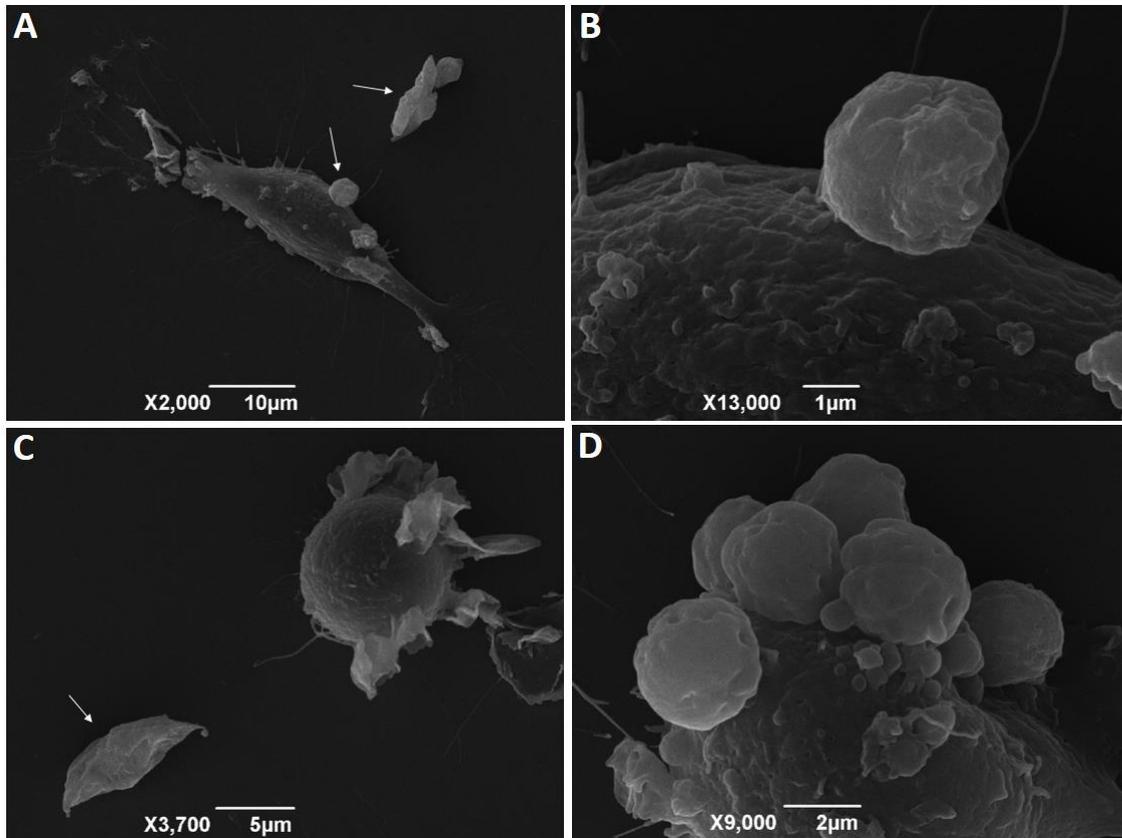


Figura 38: Interação entre *T. caninum* e linhagem DH82 no tempo de 48 horas na condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: amastigota interagindo com a célula e parasito em mudança de forma (setas); **B:** interação entre amastigota e célula; **C:** parasito em mudança de forma evolutiva (seta); **D:** detalhe de aglomerados de amastigotas;

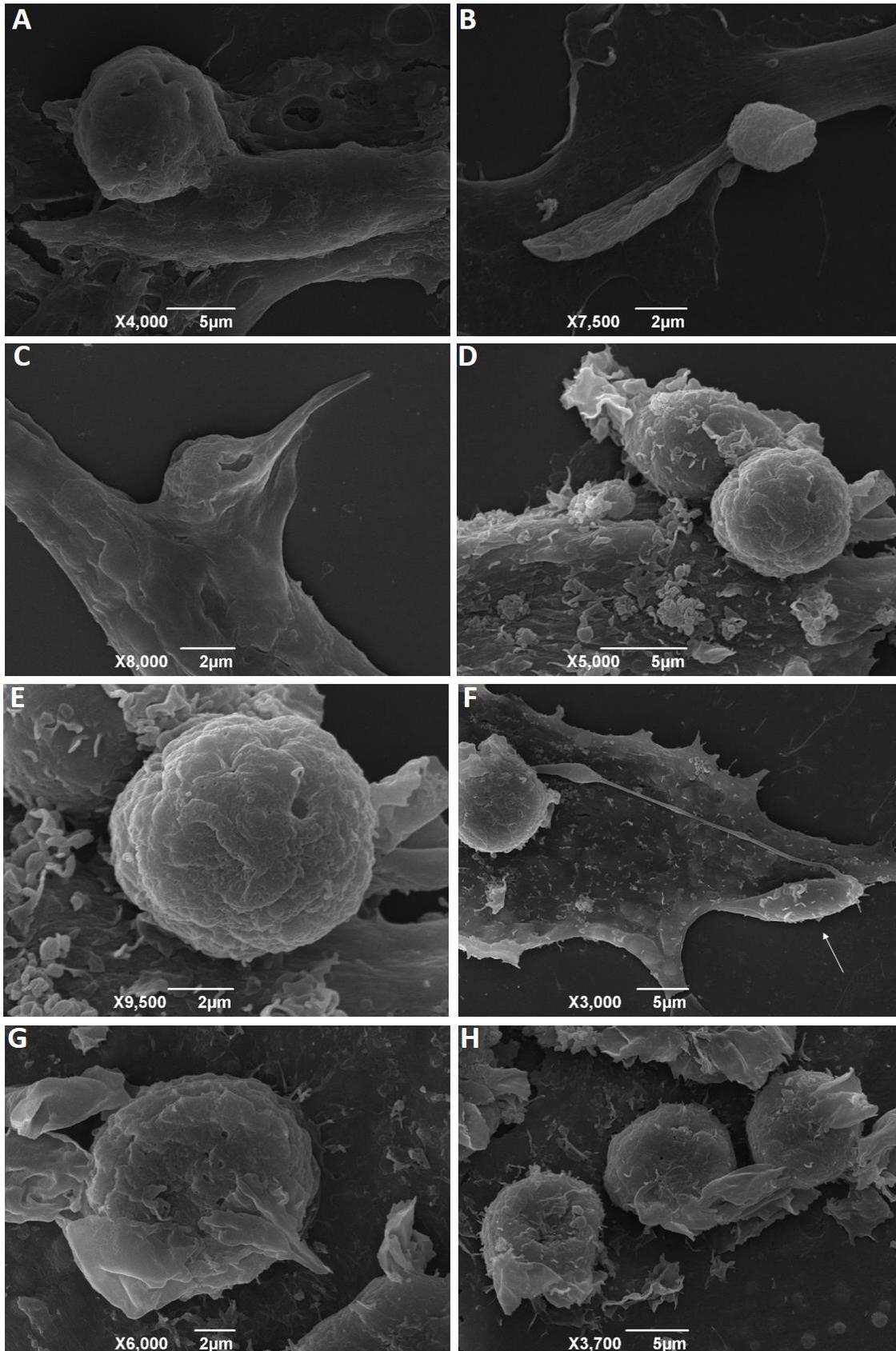
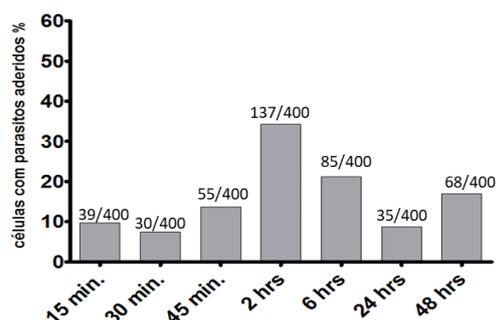


Figura 39: Interação entre *T. caninum* e linhagem DH82 no tempo de 48 horas na condição com meio suplementado com BSA por MEV. A e B: interação de amastigota com a célula; C: parasito aderido; D e E: detalhe da amastigota; F: amastigota e epimastigota aflagelar (seta) em interação com a célula; G e H: detalhe do aglomerado de amastigota;

4.4.2 Análise das taxas de infecção e adesão da linhagem DH82 e TC

Os resultados da taxa de adesão de *T. caninum* a linhagem DH82, que é o percentual de células que continham parasitos aderidos e taxa de infecção, que é o percentual de células em que havia parasitos interiorizados, estão representados nos gráficos 5 e 6 respectivamente. As taxas foram calculadas a partir de contagem aleatória de 200 células em duas lamínulas, contabilizando um total de 400 células por cada tempo de cada experimento.

Taxa de adesão DH 82 + *T.caninum* (SFB)



Taxa de adesão DH 82 + *T.caninum* (BSA)

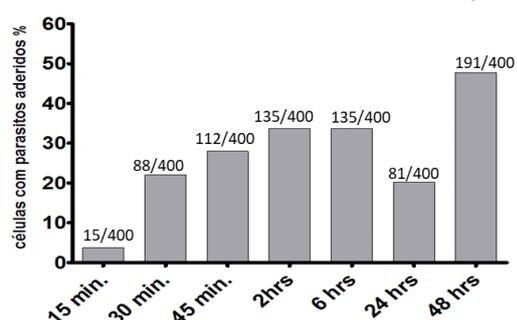
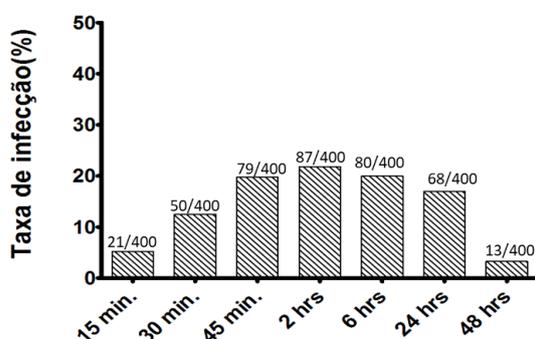


Gráfico 5 : Taxa de adesão de *T. caninum* em interação com a linhagem DH82. A: condição com SFB; B: condição com BSA;

DH82 + *T.caninum* (SFB)



DH82 + *T.caninum* (BSA)

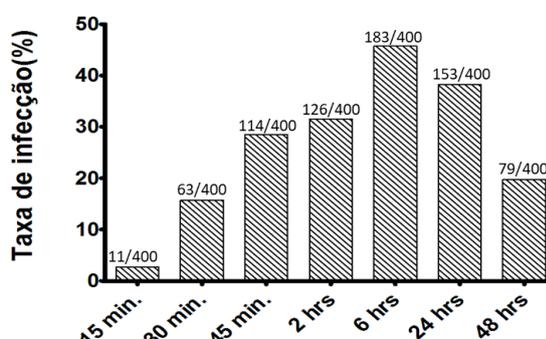


Gráfico 6 : Taxa de infecção de *T. caninum* em interação com a linhagem DH82. A: condição com SFB; B: condição com BSA;

4.4.3 *T. caninum* - M ϕ (TC- M ϕ)

Foi realizada também a interação entre *T. caninum* e macrófagos peritoneais de camundongos (M ϕ). Em todos os 7 tempos da cinética ocorreu adesão da forma epimastigota aflagelar e presença da forma amastigota no interior das células ou em contato com a célula ou livres ao redor delas. Detalhes de adesão, interação e interiorização dos parasitos nas células foram descritos em cada tempo estabelecido nesse estudo pelas técnicas de microscopia MCC, MEV e MET.

15 minutos de interação (TC- Mφ)

Por MCC na interação *T. caninum* - Mφ com meio suplementado com SFB, as células apresentaram-se volumosas. Foi observado nesse tempo de interação, a adesão da forma epimastigota aflagelar com a célula (Fig. 40 B), presença de amastigota interiorizada em vacúolos estreitos e amastigotas livres (Fig. 40 A). Foi possível observar também, interação entre amastigota e Mφ a partir de prolongamentos da célula (Fig. 40 C). Na figura 40 D, sugere-se que o parasito esteja aderido à célula e em mudança da forma amastigota para epimastigota aflagelar. Por MEV, na condição com SFB as micrografias mostraram que a adesão de epimastigota aflagelar no Mφ ocorre pela parte posterior do parasito, pela parte anterior ou por todo o corpo celular do parasito aderido à célula, não denotando um único padrão de adesão (Fig. 42 A - C). Foi possível observar também por MEV, adesão de epimastigota aflagelar sem a projeção da célula sugerindo uma adesão de forma ativa por parte do parasito (Fig. 42 D).

Na condição com meio suplementado com BSA foram visualizadas células pouco espalhadas, e os mesmos eventos descritos para SFB. Foi observada a adesão de epimastigota aflagelar (fig. 41A e B), células interagindo com amastigota (Fig. 41 C e D) e amastigota interiorizada (Fig. 41 D) e livres (Fig. 41 A e C). Por MEV, foram observadas as mesmas descrições citadas na condição com meio suplementado com SFB (Fig. 43 A-C) e parasito na forma amastigota em processo de mudança de forma para epimastigota aflagelar (Fig. 43 D).

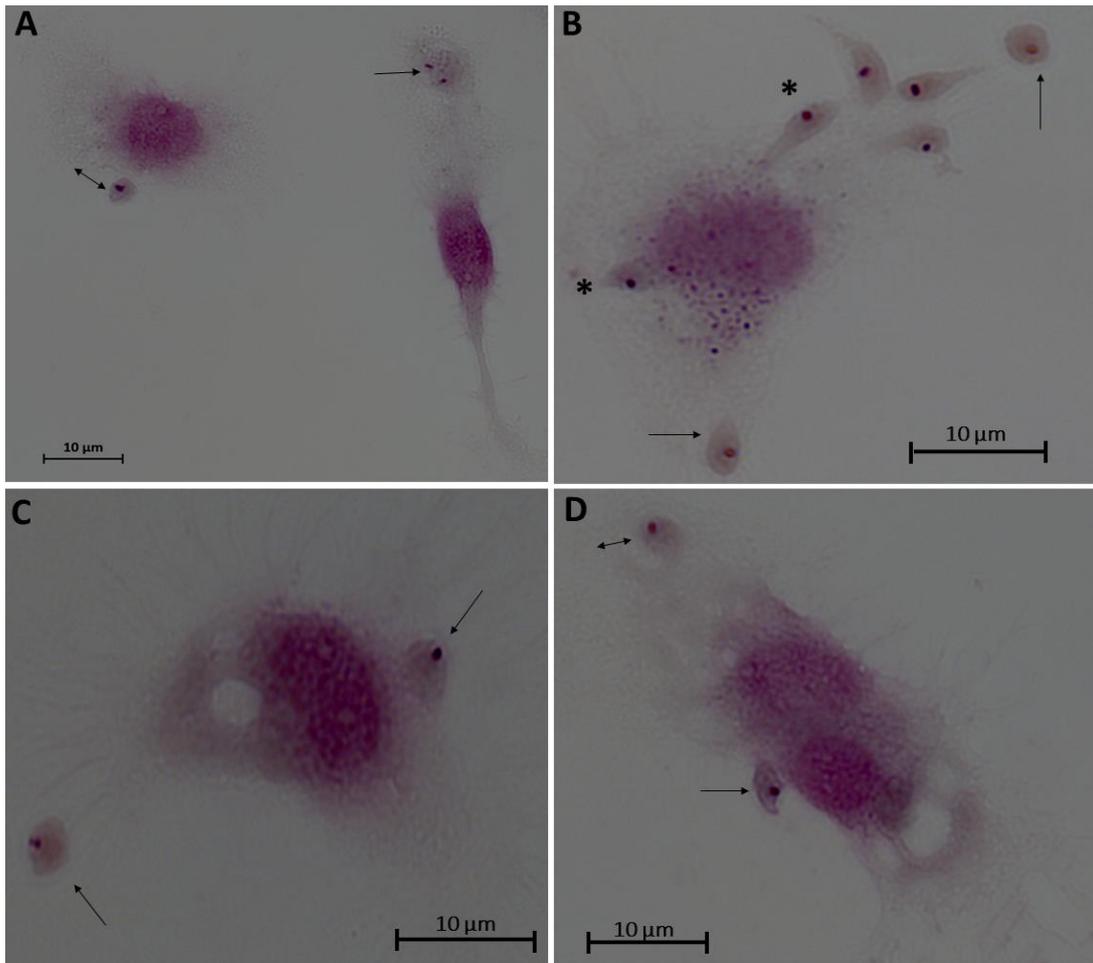


Figura 40: Interação entre *T. caninum* e macrófago peritoneal (M ϕ), no tempo de 15 minutos em condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. **A:** amastigotas em interação com a célula (seta dupla) e interiorizadas na célula (seta); **B:** adesão de epimastigota aflagelar (EA) (*) e amastigota livre (seta); **C:** interação de amastigotas com a célula; **D:** interação de amastigota com a célula (seta dupla) e parasito sugerindo mudança de forma de amastigota para EA (seta);

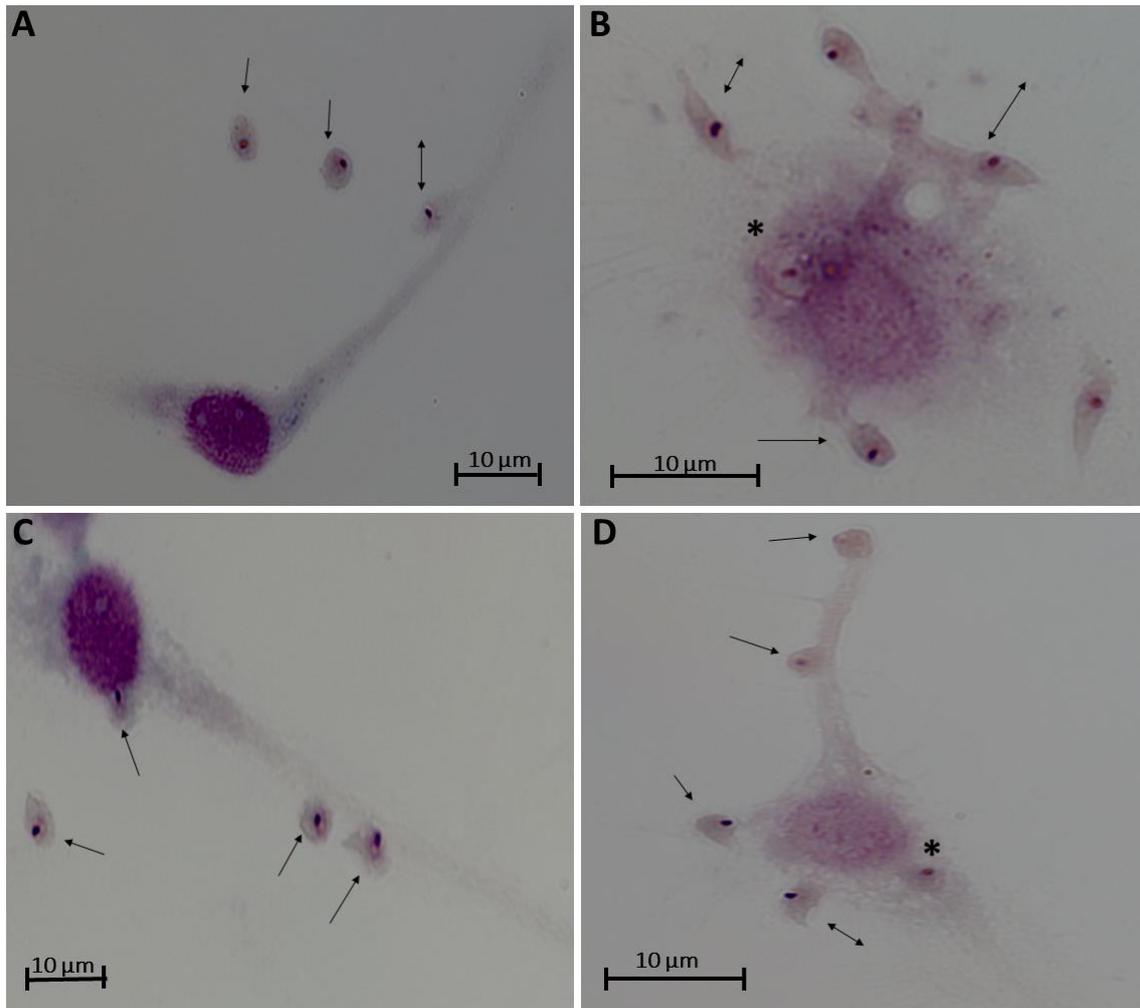


Figura 41: Interação entre *T. caninum* e M ϕ , no tempo de 15 minutos em condição com meio suplementado com BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: EA aderido à célula (seta dupla) e amastigotas livres (seta); **B:** adesão de EA na célula pelo corpo, porção anterior e posterior do parasito (seta dupla); **C:** interação de amastigota com a célula e livre; **D:** amastigotas em interação com a célula (seta) e interiorizada (*), parasito sugestivo de mudança de forma (seta dupla);

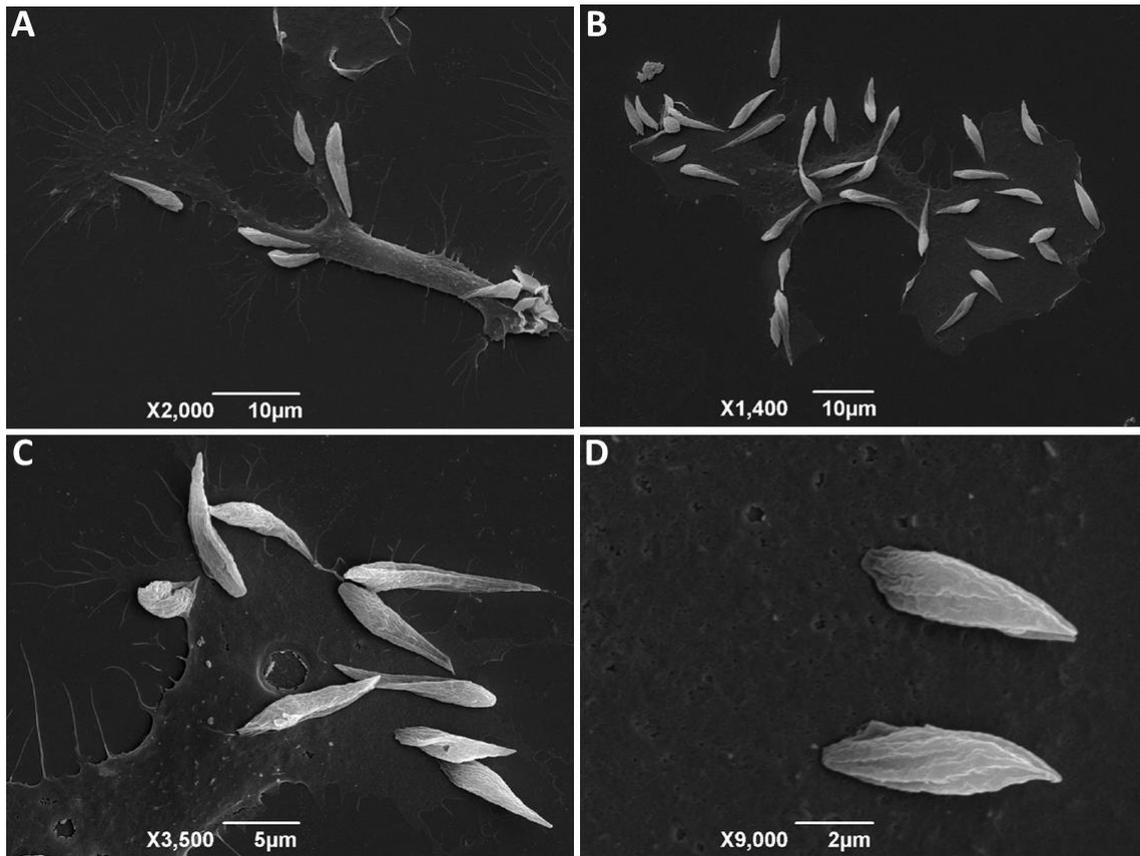


Figura 42: Interação entre *T. caninum* e MØ no tempo de 15 minutos em condição com meio suplementado com SFB por MEV. A – C: adesão do parasito na forma EA; D: detalhe da adesão da forma EA sem projeção celular, sugerindo que o parasito faz adesão de forma ativa;

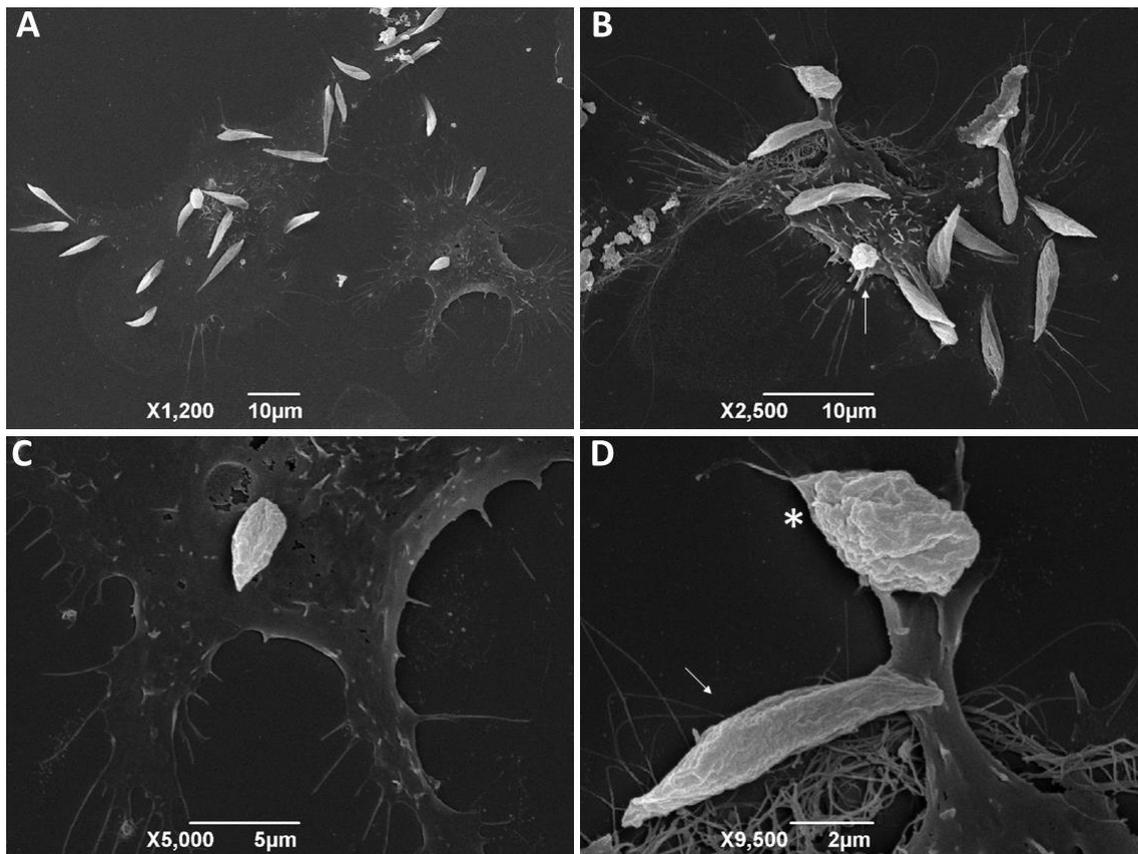


Figura 43: Interação entre *T. caninum* e Mφ no tempo de 15 minutos em condição com meio suplementado com BSA por MEV. A e B: adesão da forma EA no Mφ; C: adesão do parasito; D: adesão do parasito na célula (seta) e amastigota em processo de mudança de forma (*);

30 minutos de interação (TC- Mφ)

Com 30 minutos de interação, na condição com meio suplementado com SFB, por MCC foram observados parasitos livres e células com citoplasma fragmentados (Fig. 44 C). As células que não continham parasito estavam espalhadas e volumosas. Foi observada mais de uma amastigota no mesmo vacúolo parasitóforo (Fig. 44 A), e também uma amastigota em vacúolo apertado (Fig. 44 B). Também foi observada a interação entre amastigotas e entre a célula, com a formação de aglomerados de amastigotas (Fig. 44 C e D). Pela técnica de MEV, foi observada intensa adesão entre *T. caninum* na forma epimastigota aflagelar e Mφ por diferentes partes do parasito (Fig. 46 A - D).

Na interação entre *T. caninum* e Mφ em meio suplementado com BSA, foram observadas amastigotas interiorizadas (Fig 45A, D e E), interação com amastigotas (Fig. 45 B, D e E), amastigotas livres e em mudança de forma para

epimastigota aflagelar (Fig. 45 D), ocorrendo em células mais alongadas ou arredondadas (Fig. 45 A-D). Por MEV, foi observada intensa adesão de epimastigota aflagelar com a célula (Fig. 47 A - C) e interação de amastigota arredondadas ou ovoides com a célula (Fig. 47 B - D).

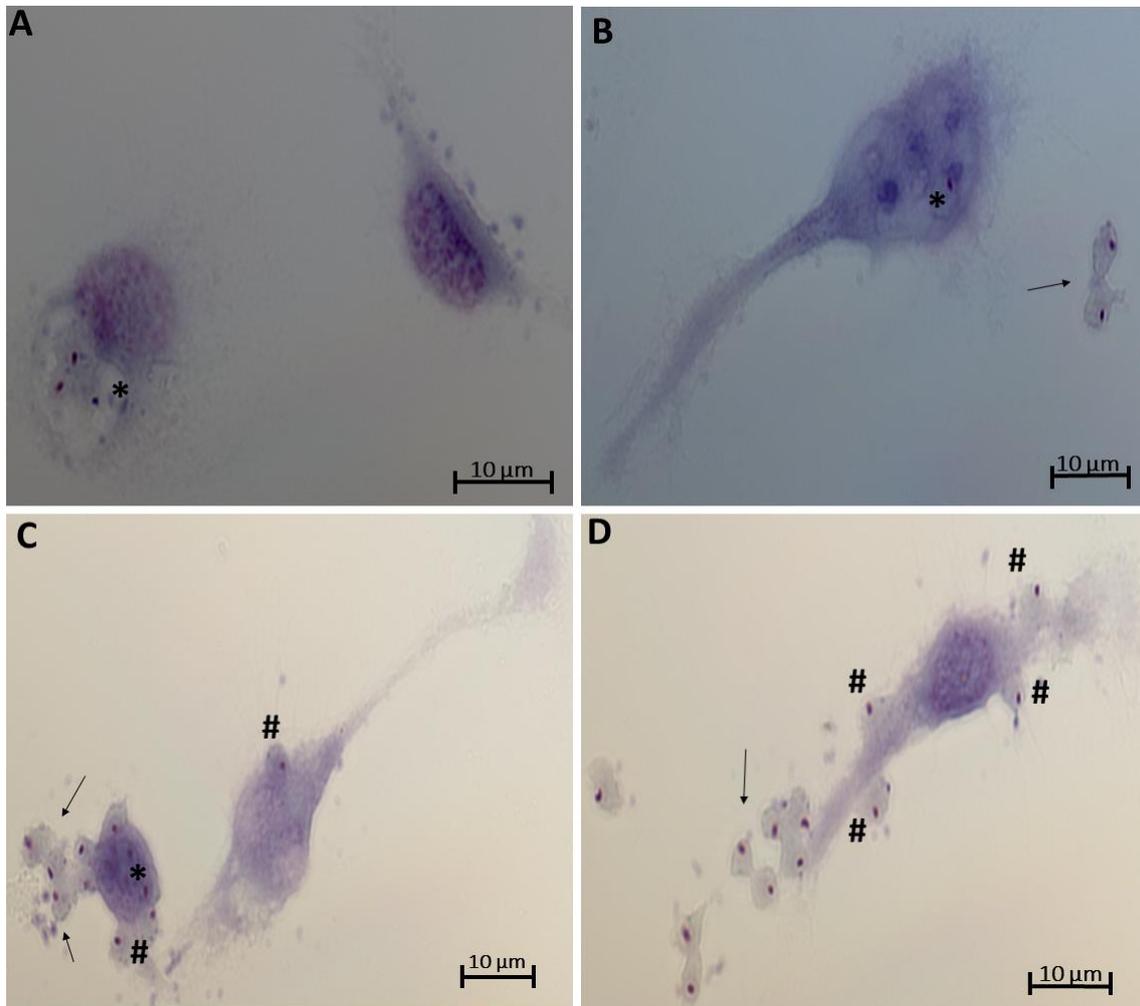


Figura 44: Interação entre *T. caninum* e Mφ, no tempo de 30 minutos na condição em condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: amastigotas interiorizadas na célula; **B:** amastigota internalizada (*) e fora da célula e parasitos em processo de mudança de forma; **C:** interação de amastigota com a célula (#) amastigotas internalizadas e em volta da célula amastigotas sugerindo processo de evasão da célula (seta); **D:** célula alongada com interação de amastigotas (#) e aglomerados de amastigotas (seta);

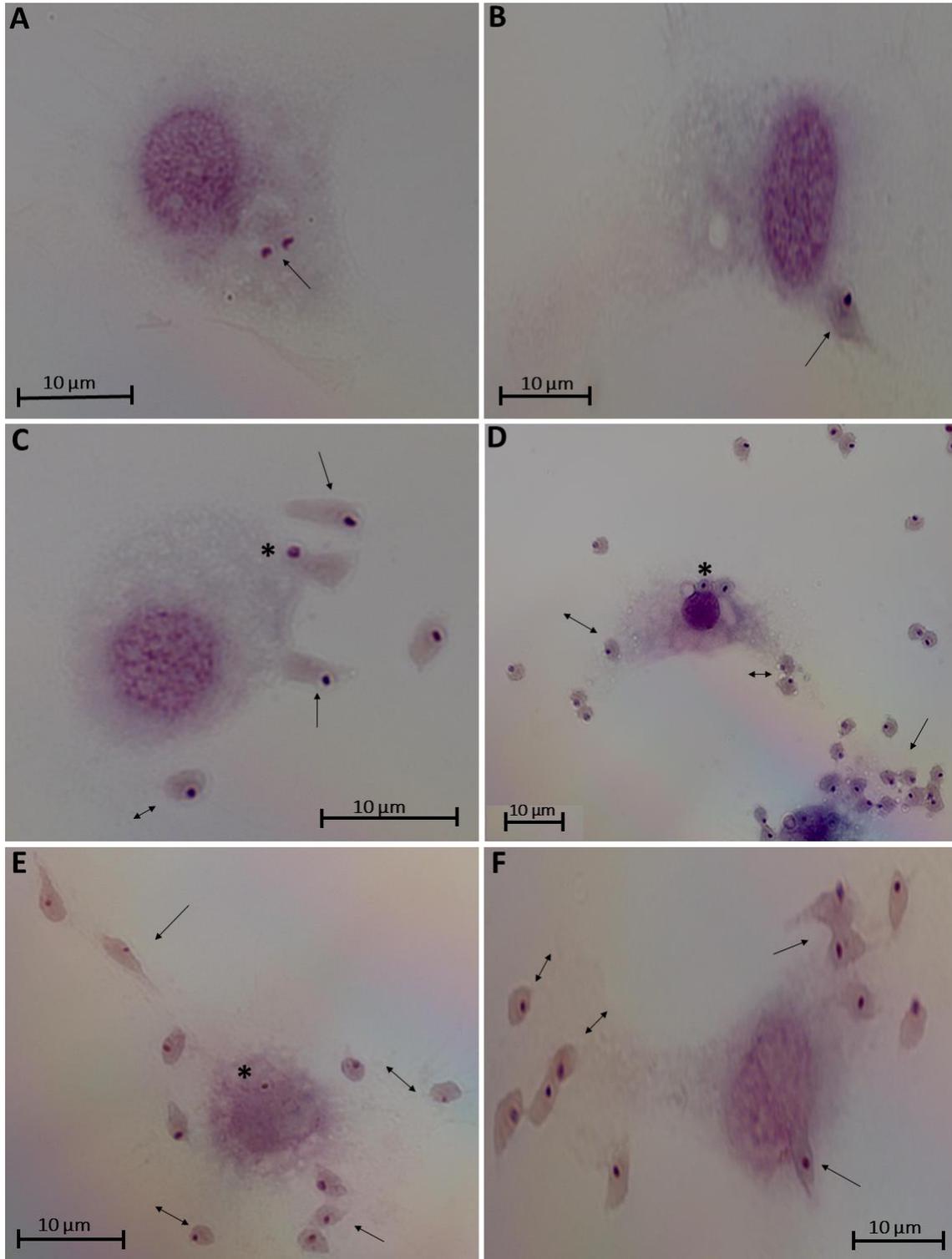


Figura 45 : Interação entre *T. caninum* e Mφ, no tempo de 30 minutos em condição com meio suplementado com BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: interiorização de amastigota; **B:** interação de amastigota com a célula; **C:** adesão de EA (seta), interiorização de amastigota (*) e amastigotas livres (seta dupla); **D:** amastigotas internalizadas (*), em aglomeração próximo à célula (seta) e em mudança de forma (seta dupla); **E e F:** adesão de EA, interação de amastigotas com a célula (seta) e amastigotas livres e em mudança de forma (seta dupla);

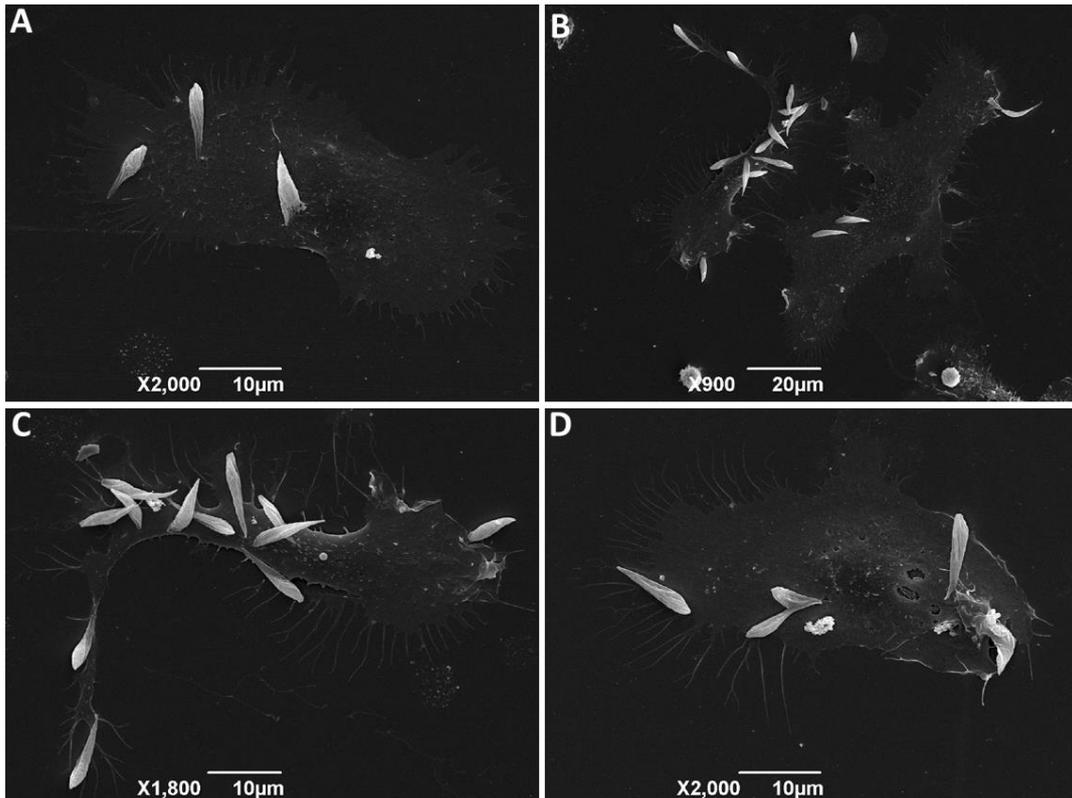


Figura 47: Interação entre *T. caninum* e Mφ no tempo de 30 minutos em condição com meio suplementado com SFB por MEV. Adesão entre macrófago e forma epimastigota aflagelar por diferentes partes do corpo;

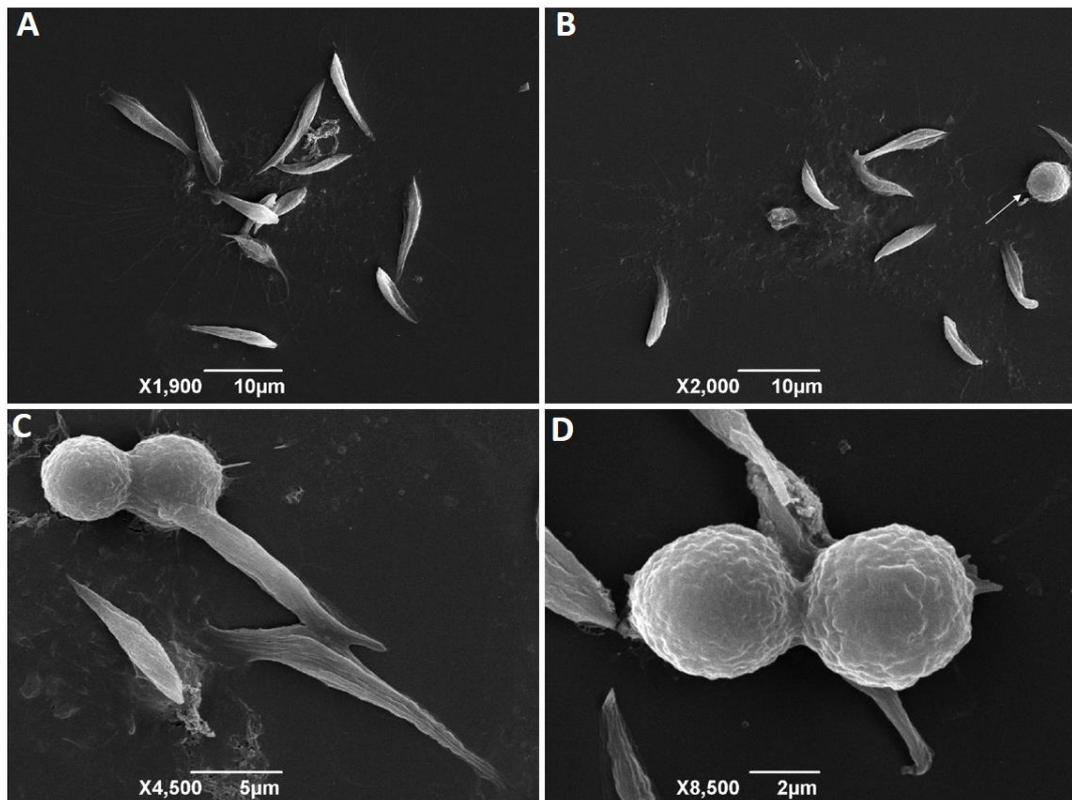


Figura 46: Interação entre *T. caninum* e Mφ no tempo de 30 minutos em condição com meio suplementado com BSA por MEV. **A e B:** adesão do parasito na forma epimastigota aflagelar; **C:** adesão da forma EA e interação com amastigotas (seta); **D:** detalhe de amastigotas;

45 minutos de interação (TC- M ϕ)

A análise com 45 minutos de interação por MCC, na condição com meio suplementado com SFB, demonstraram amastigotas livres em interação com células M ϕ (Fig. 48 A), células vacuolizadas e infectadas com amastigotas interiorizadas (Fig. 48 B), e parasitos livres em mudança da forma amastigota para epimastigota aflagelar. Foi possível observar também amastigotas com conformação mais alongada semelhante à forma epimastigota aflagelar livres (Fig. 48 C) e interagindo com a célula (Fig. 48 D). Por MEV, foi visualizada a adesão de epimastigota aflagelar à célula (Fig. 50 A), a interação entre amastigotas e M ϕ (Fig. 50 B), a mudança de forma amastigota para epimastigota aflagelar (Fig. 50 C). Foi possível observar nas células a presença de depressões arredondadas em formato arredondado que sugere possível saída da amastigota por essa região, (Fig. 50 C), além de protuberância arredondada sob a célula que sugere que seja a forma amastigota no interior da célula (Fig. 50 D). Pela técnica de MET, foi possível observar o parasito interiorizado (Fig. 52 A e B), amastigotas interiorizadas que aparentam estar com organelas em processo de destruição (Fig. 52 C), adesão de epimastigota aflagelar à célula (Fig. 52 D), interação de amastigota com o M ϕ (Fig. 52 E e F, G e H), (Fig. 52 G e H). Foi possível observar o detalhe da interação, no qual o M ϕ projeta um prolongamento celular sobre o parasito e também detalhe da interação de amastigota com a célula (Fig. 52 I- L).

Na interação utilizando meio suplementado com BSA, foi possível observar aglomerados de amastigotas e a interação entre amastigotas e célula (Fig. 49 A). Foi possível observar também eventos diferentes ocorrendo numa mesma célula: (i) adesão de epimastigotas aflagelares já quase que interiorizado na célula, (ii) amastigota interiorizada e (iii) amastigota em mudança para a forma epimastigota aflagelar e inúmeras amastigotas livres (Fig. 49 C e D). Por MEV, assim como na condição com meio suplementado com SFB, foi observada a adesão da forma epimastigota aflagelar à célula (Fig. 51 A e B), interação entre a amastigota e célula (Fig. 51 C) e célula aparentemente rompida e com protuberância sugestiva de amastigota (Fig. 51 D). Por MET, foram visualizadas, uma única célula com epimastigota aflagelar aderido à célula com duas amastigotas interiorizadas (Fig. 53 A). Foi possível observar detalhe da adesão de epimastigota em prolongamento projetado pela célula ancorando o parasito

no processo de endocitose (Fig. 53 B), a forma epimastigota aflagelar com a bolsa flagelar vazia aderida a célula (Fig. 53 C) e também parasito contendo inúmeros corpúsculos lipídicos, interiorizado na célula (Fig. 53 D).

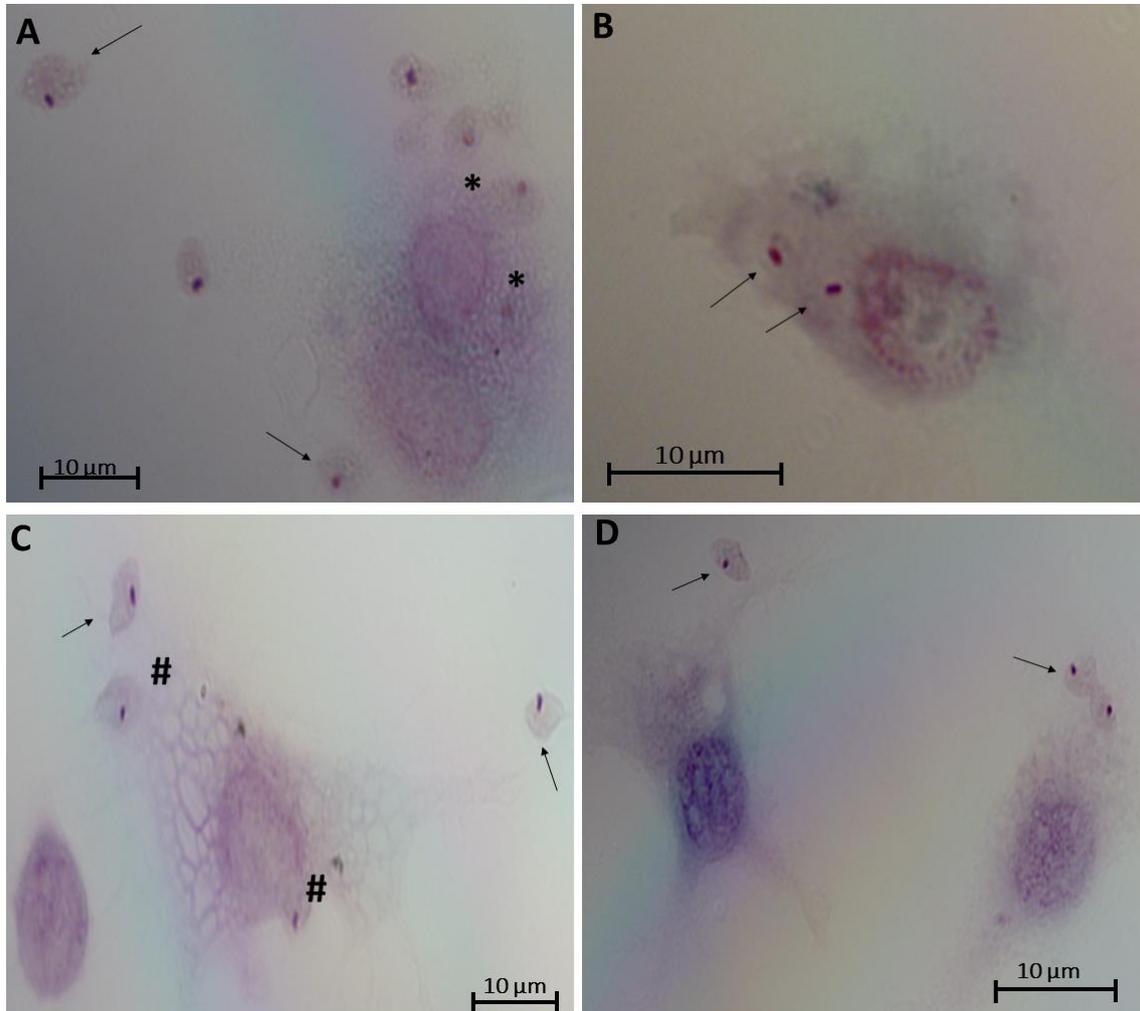


Figura 48: Interação entre *T. caninum* e Mφ, no tempo de 45 minutos em condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: interação entre Mφ e amastigotas (*) e amastigotas livres em forma ovoide, com forma mais próxima da forma EA (seta); **B:** amastigotas interiorizadas em vacúolos apertados; **C:** célula vacuolizada com interação com amastigota (#) e amastigotas livres (seta); **D:** amastigotas interagindo com prolongamentos da célula;

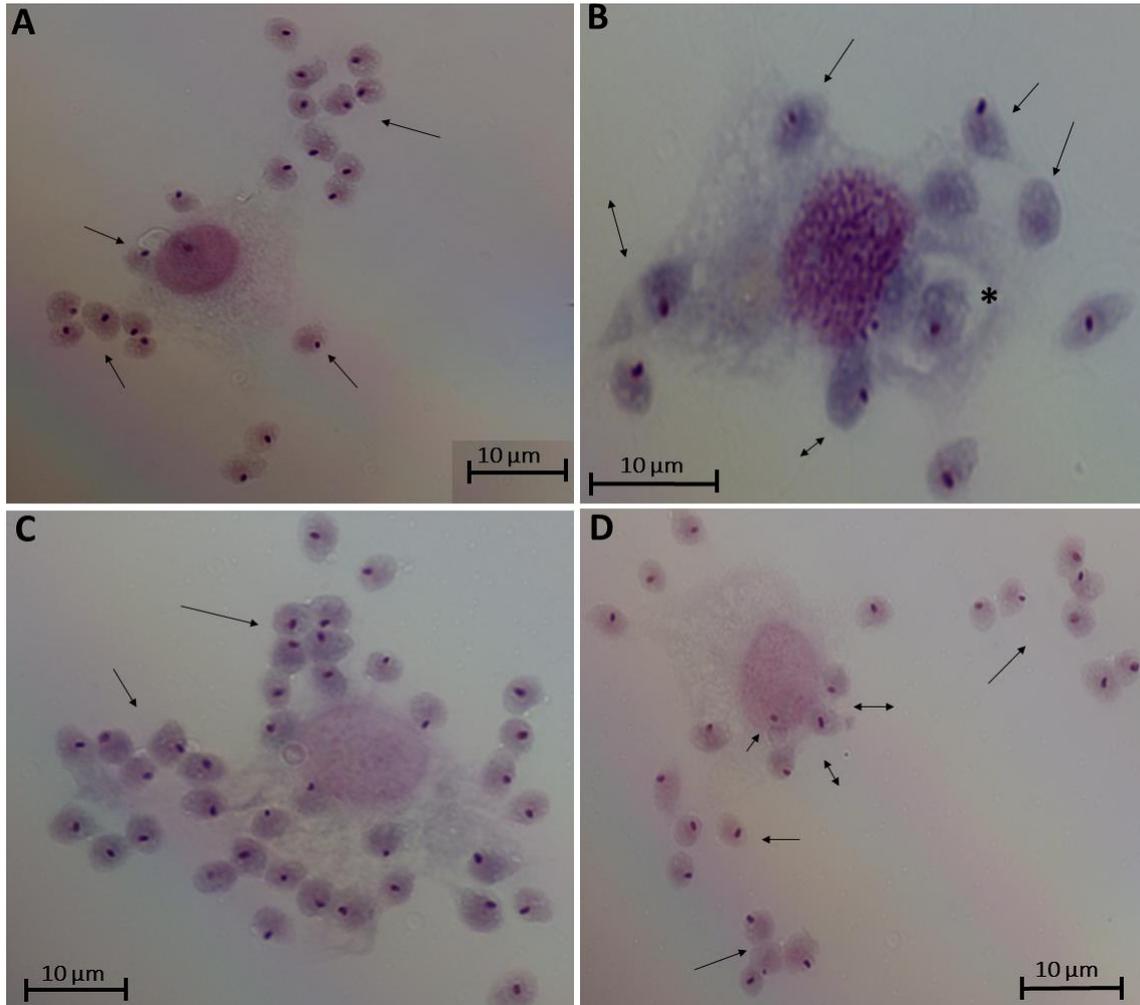


Figura 49: Interação entre *T. caninum* e M ϕ , no tempo de 45 minutos em condição com meio suplementado com BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: interação entre amastigota e célula; **B:** célula vacuolizada com amastigota interiorizada (*) em interação com amastigota ovoide (seta) e parasito na forma EA aderido à célula (seta dupla); **C:** célula desconstruída, interagindo com amastigota; **D:** interação de amastigota com a célula (seta dupla) e aglomerados de amastigotas livres;

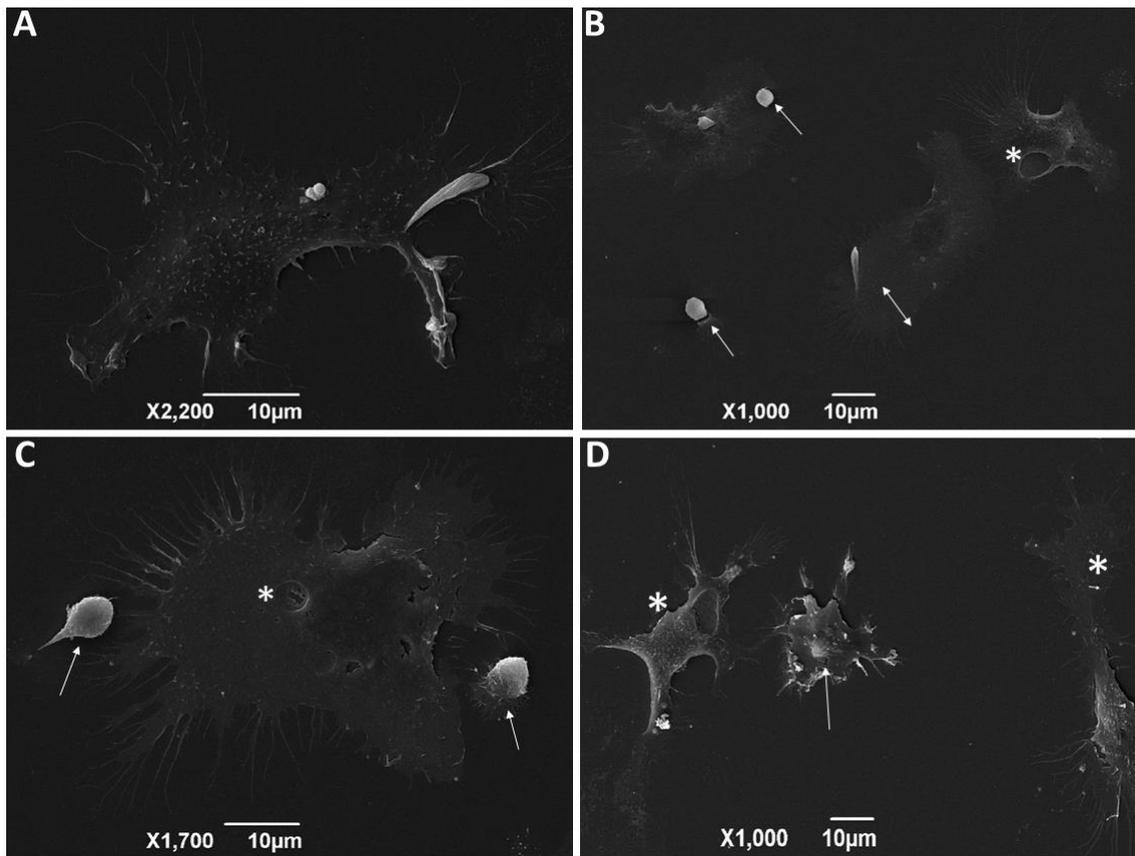


Figura 50: Interação entre *T. caninum* e Mφ no tempo de 45 minutos em condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: adesão de epimastigota aflagelar (EA) à célula; **B:** EA aderido na célula (seta dupla), amastigota em interação com a célula (seta) e depressão arredondada sugestiva da saída de amastigotas(*); **C:** parasito em mudança de forma e depressão arredondada sugestiva da saída de amastigota (*) **D:** célula livres (*) e interação com amastigota (seta);

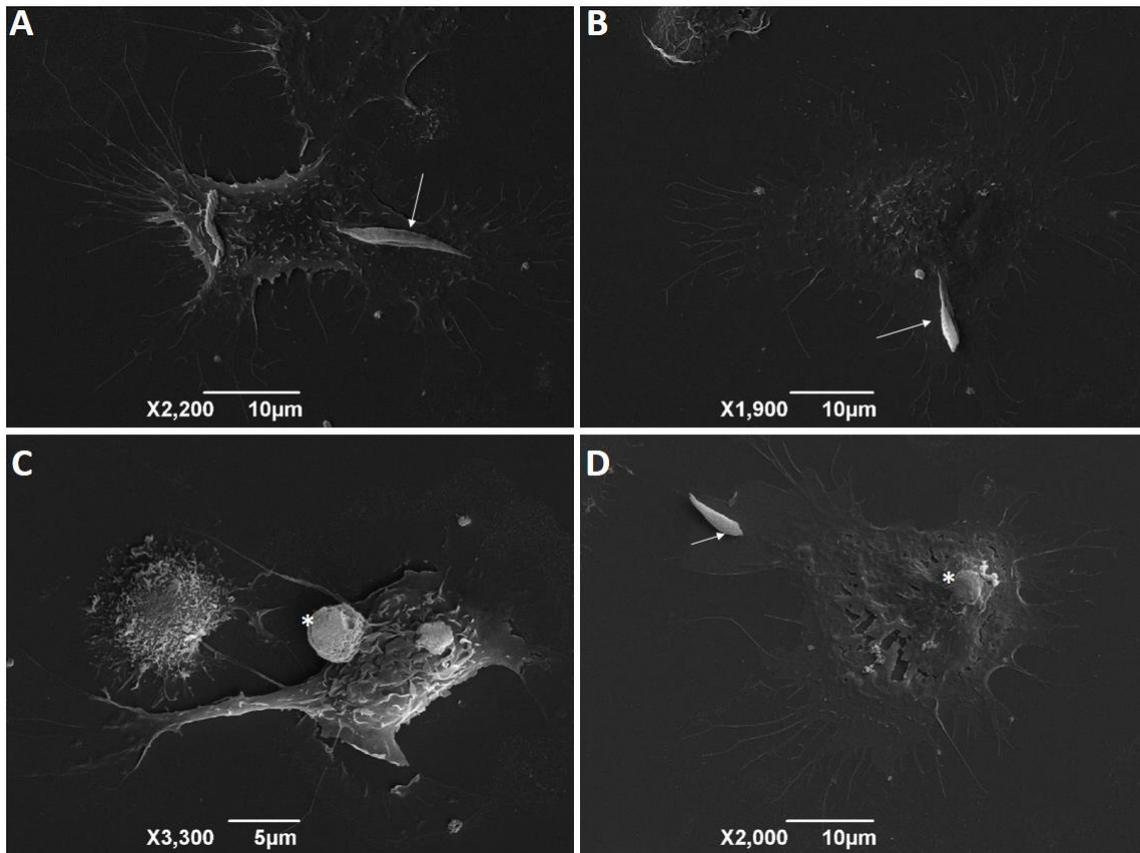
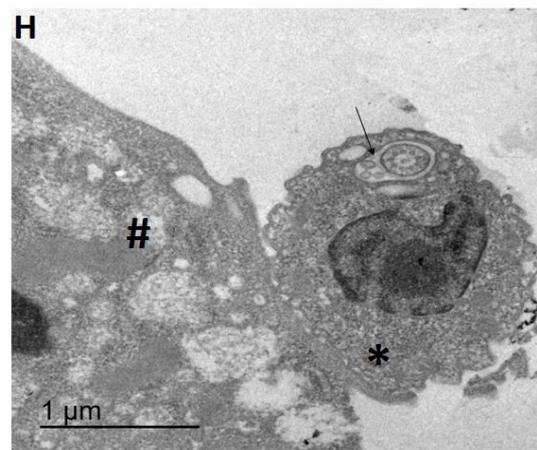
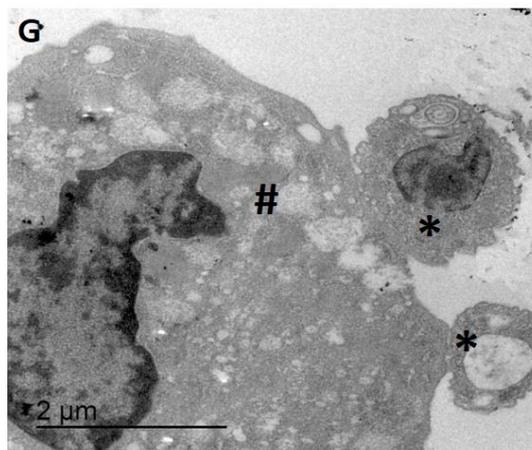
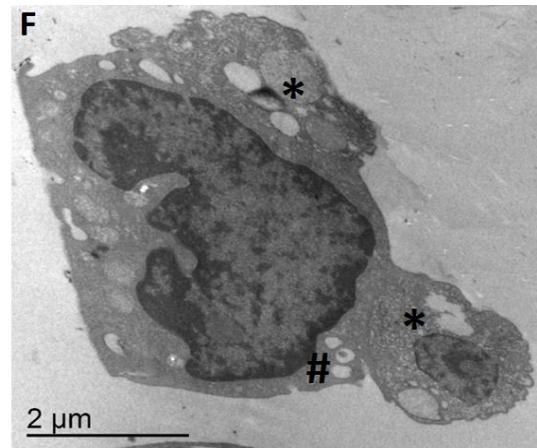
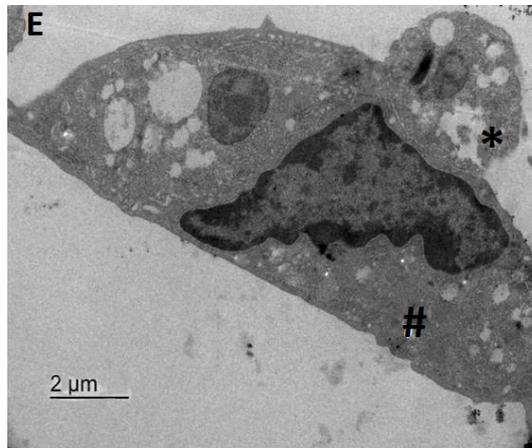
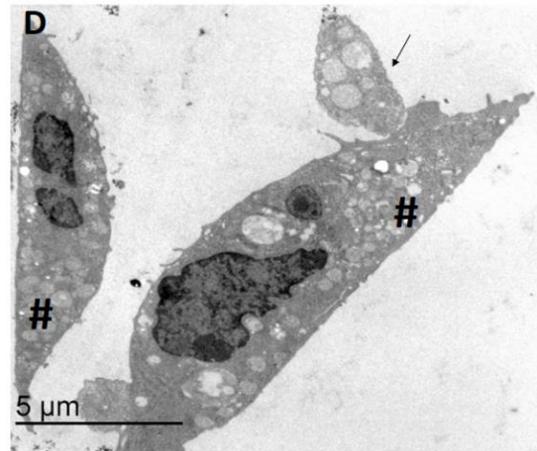
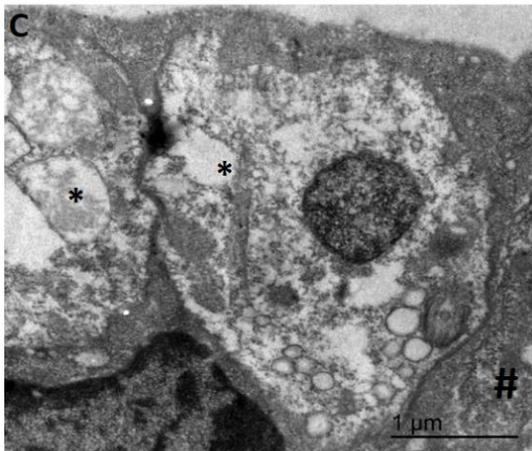
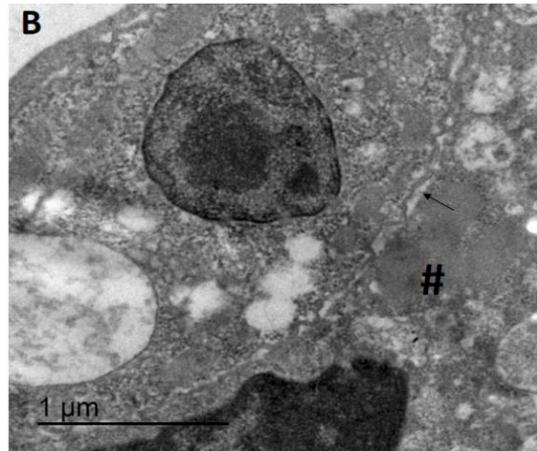
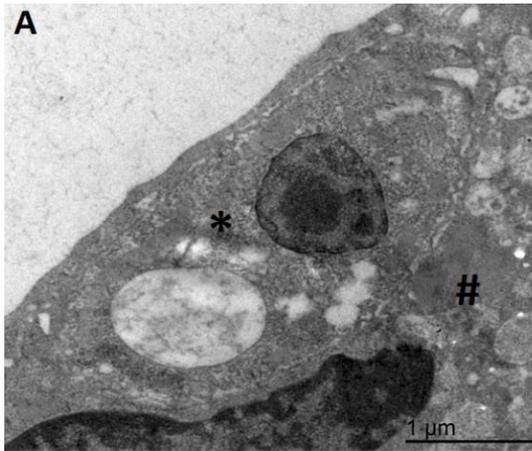


Figura 51: Interação entre *T. caninum* e Mφ no tempo de 45 minutos em condição com meio suplementado com BSA por MEV. A e B: adesão de EA na célula por todo o corpo; C: interação entre amastigota e célula (*); D: adesão entre EA pela parte posterior do corpo (seta) e interação com amastigota (*) com a célula;



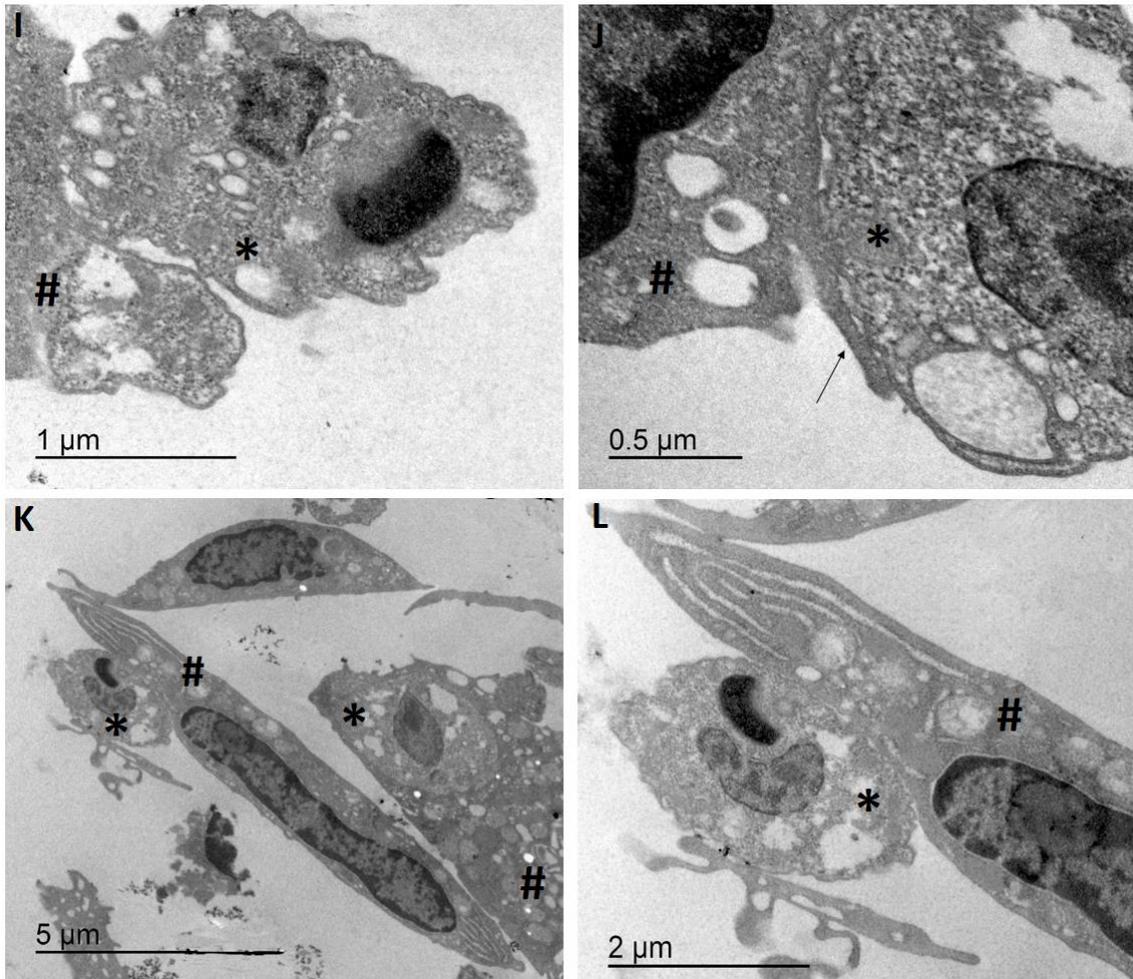


Figura 52: Interação entre *T. caninum* e Mφ no tempo de 45 minutos em condição com meio suplementado com SFB por MET. A: parasito interiorizado na célula; B: detalhe do parasito em vacúolo estreito (seta); C: Parasito endocitado na forma amastigota em estado de degeneração; D: adesão de epimastigota aflagelar (EA) com detalhe da endocitose com prolongamento citoplasmático; E: interação de amastigota; F: interação de dois parasitos durante processo de endocitose; G: interação de duas amastigotas com a célula; H: detalhe da amastigota em interação com a célula, evidenciando a estrutura da bolsa flagelar contendo flagelo; I: formação do prolongamento da célula em torno do parasito; J: detalhe da projeção realizada pela célula em torno do parasito no processo de endocitose; K: interação de amastigota e endocitose; L: detalhe da interação da amastigota com Mφ;

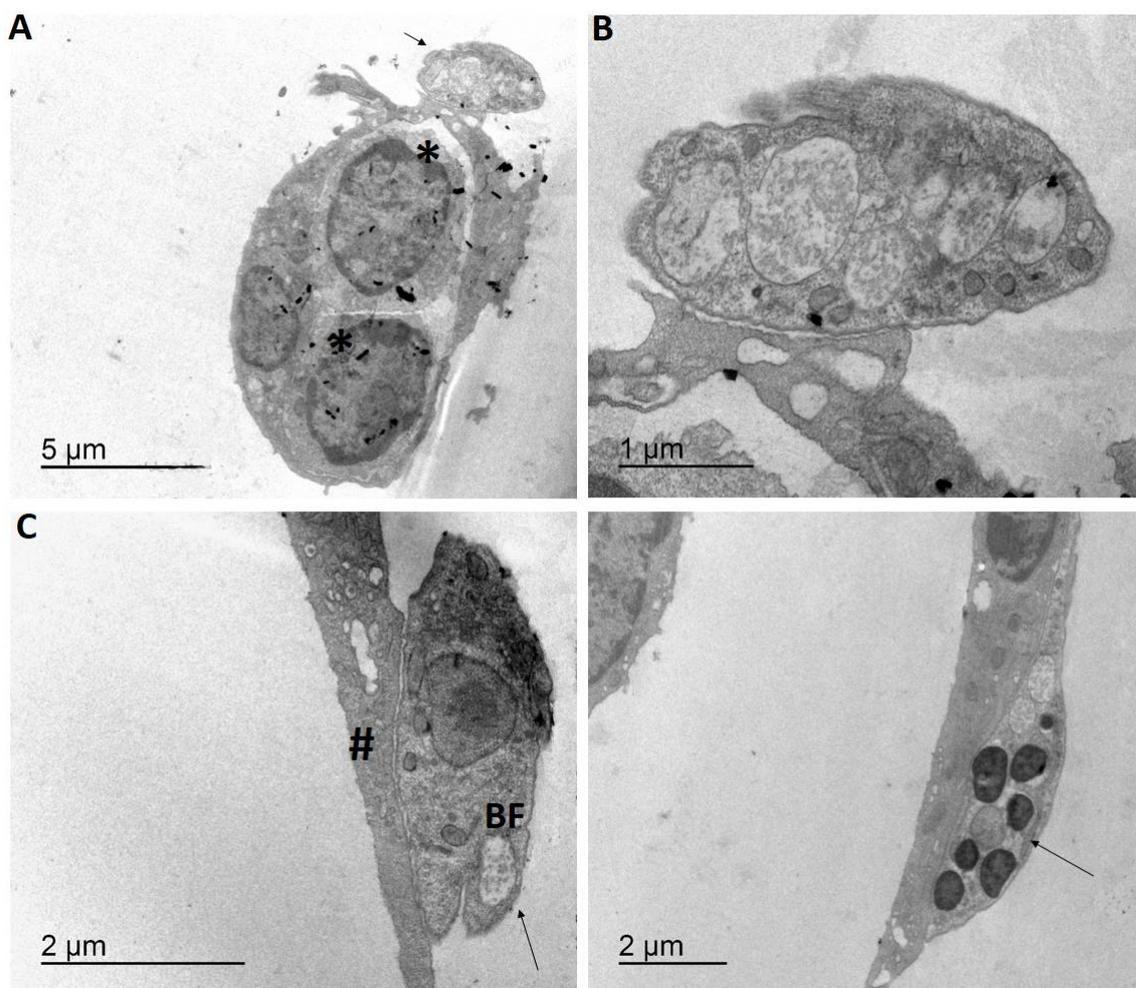


Figura 53: Interação entre *T. caninum* e Mφ no tempo de 45 minutos em condição com o meio suplementado com BSA por MET. A: parasito aderido e dois endocitados na célula (*); **B:** adesão (detalhe); **C:** parasito aderido em destaque da seta pode-se visualizar a bolsa flagelar vazia; **D:** forma EA endocitada;

2 horas de interação (TC- Mφ)

Na análise da interação no tempo de 2 horas na condição com meio suplementado com SFB foi possível observar, por MCC, parasitos livres, células com a forma amastigota endocitada (Fig. 54 A), amastigotas interiorizadas em células com formas arredondadas ou alongadas (Fig. 54 B-D). Pela técnica de MEV, foi observada intensa adesão por todas as partes do corpo da forma epimastigota aflagelar à célula (Fig. 56 A-D), interação entre amastigotas e células. Foi possível observar também parasito em transição da forma amastigota para epimastigota aflagelar (Fig. 56 B e D).

Já na condição com meio suplementado com BSA, além do perfil apresentado na condição com SFB, por MCC, foram observados Mφs com citoplasma fragmentado contendo parasitos interiorizados (Fig. 55 A), interação e interiorização de amastigotas nas células (Fig. 55 B, D, E), amastigotas livres (Fig. 55 C) e mais de uma amastigota no mesmo vacúolo indicando a divisão do parasito (Fig. 55 E e F). Por MEV, foi possível observar eventos semelhantes da condição com meio suplementado com SFB, sendo possível observar de forma clara detalhes da adesão de epimastigota aflagelar (Fig. 57 A- F), nota-se adesão com intensa projeção de prolongamentos dos Mφs em torno do parasito (Fig. 57 D, F, H), e adesão sem a participação de prolongamentos (Fig. 57 G). Foi observada também mudança de forma amastigota para epimastigota aflagelar (Fig. 57 C) e parasito em forma de divisão (Fig. 57 C e F).

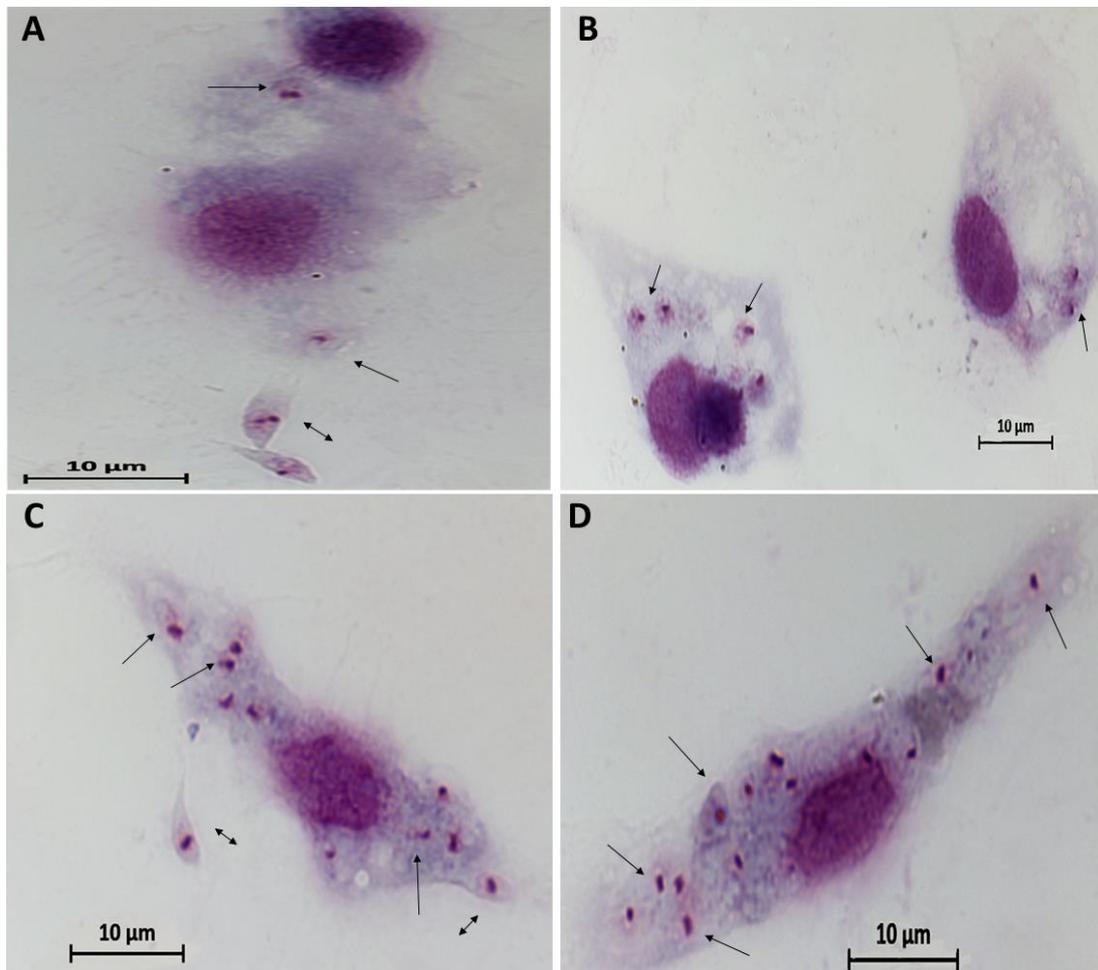


Figura 54: Interação entre *T. caninum* e Mφ, no tempo de 2 horas em condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: célula com citoplasma fragmentado com amastigota interiorizada (seta), forma epimastigota aflagelar (EA) aderida e livre (seta dupla) **B:** amastigota interiorizados em células arredondadas; **C:** Forma EA livre (seta dupla) e célula com bastante amastigotas interiorizadas (seta); **D:** Mφ alongado com inúmeras amastigotas interiorizadas nas células;

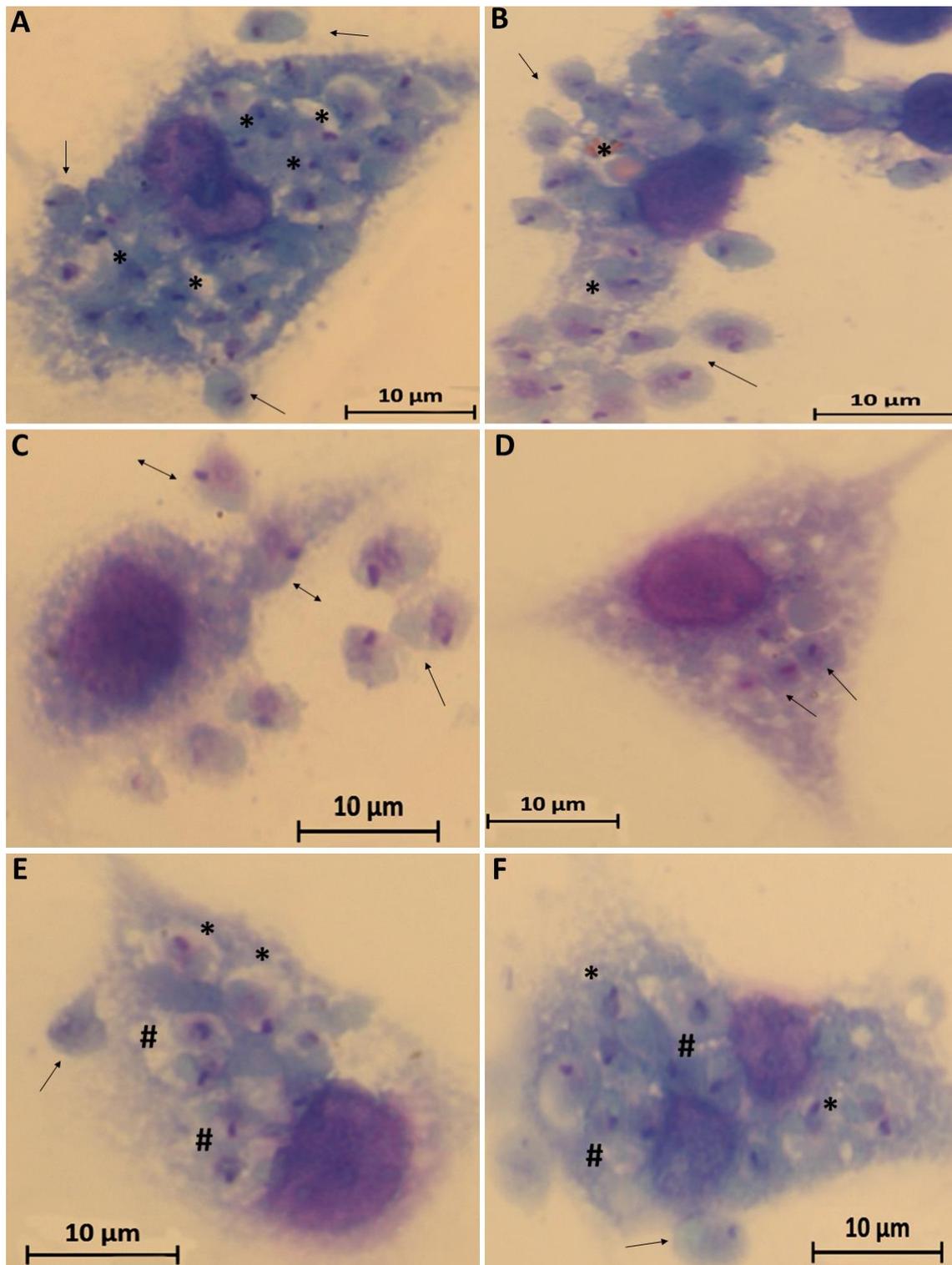


Figura 55: Interação entre *T. caninum* e Mφ, no tempo de 2 horas em condição com meio suplementado com BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: célula vacuolizada com amastigotas interiorizadas (*) e em interação com amastigotas (seta); **B :** célula com citoplasma fragmento com interação de amastigotas (*) e aglomerados de amastigota (seta); **C:** interação entre forma amastigota e célula (seta dupla) e amastigotas livres (seta); **D:** interiorização de amastigotas; **E e F:** célula desconstruída com interação de amastigota (seta), amastigotas interiorizadas (*) e mais de uma amastigota no mesmo vacúolo indicando divisão de amastigotas (#);

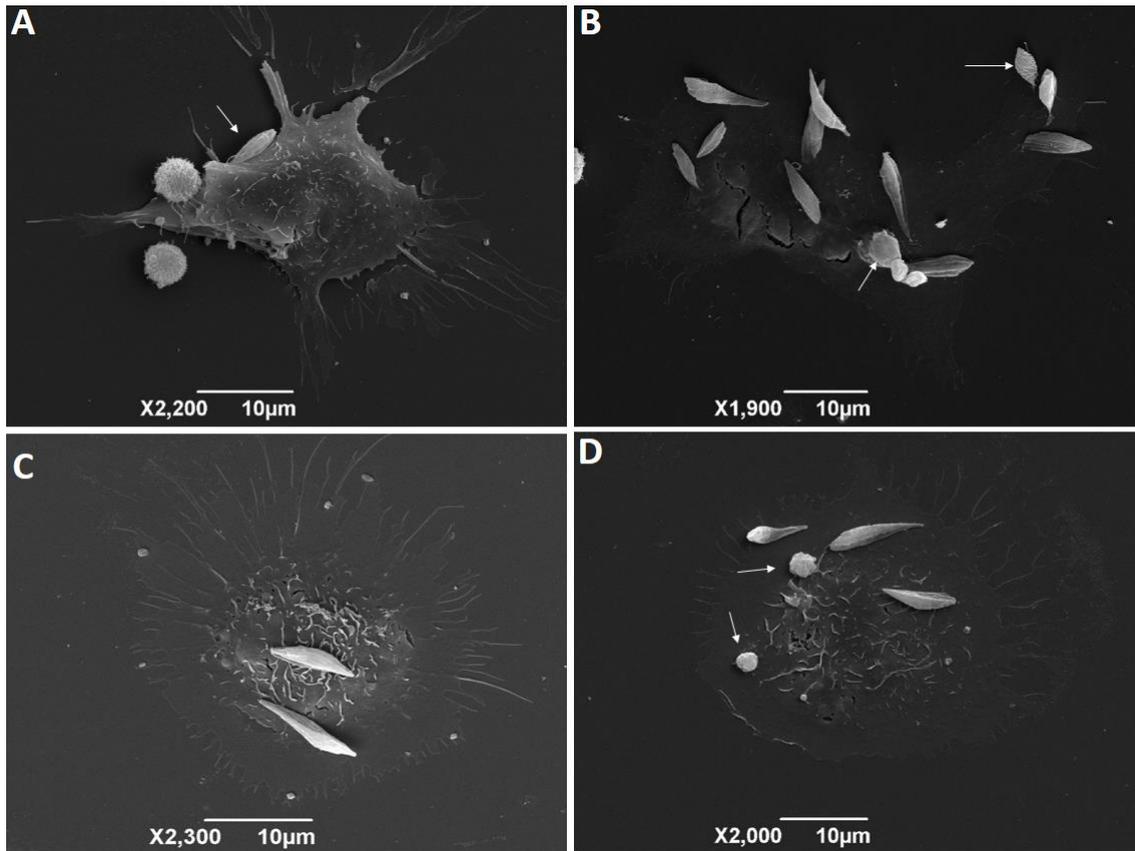


Figura 56: Interação entre *T. caninum* e Mφ no tempo de 2 horas em condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: adesão do parasito na célula; **B:** adesão de epimastigota aflagelar (EA) com a célula e transição de forma amastigota para EA; **C:** EA aderidas pelo corpo na célula; **D:** amastigota em interação com a célula e EA aderidas (setas);

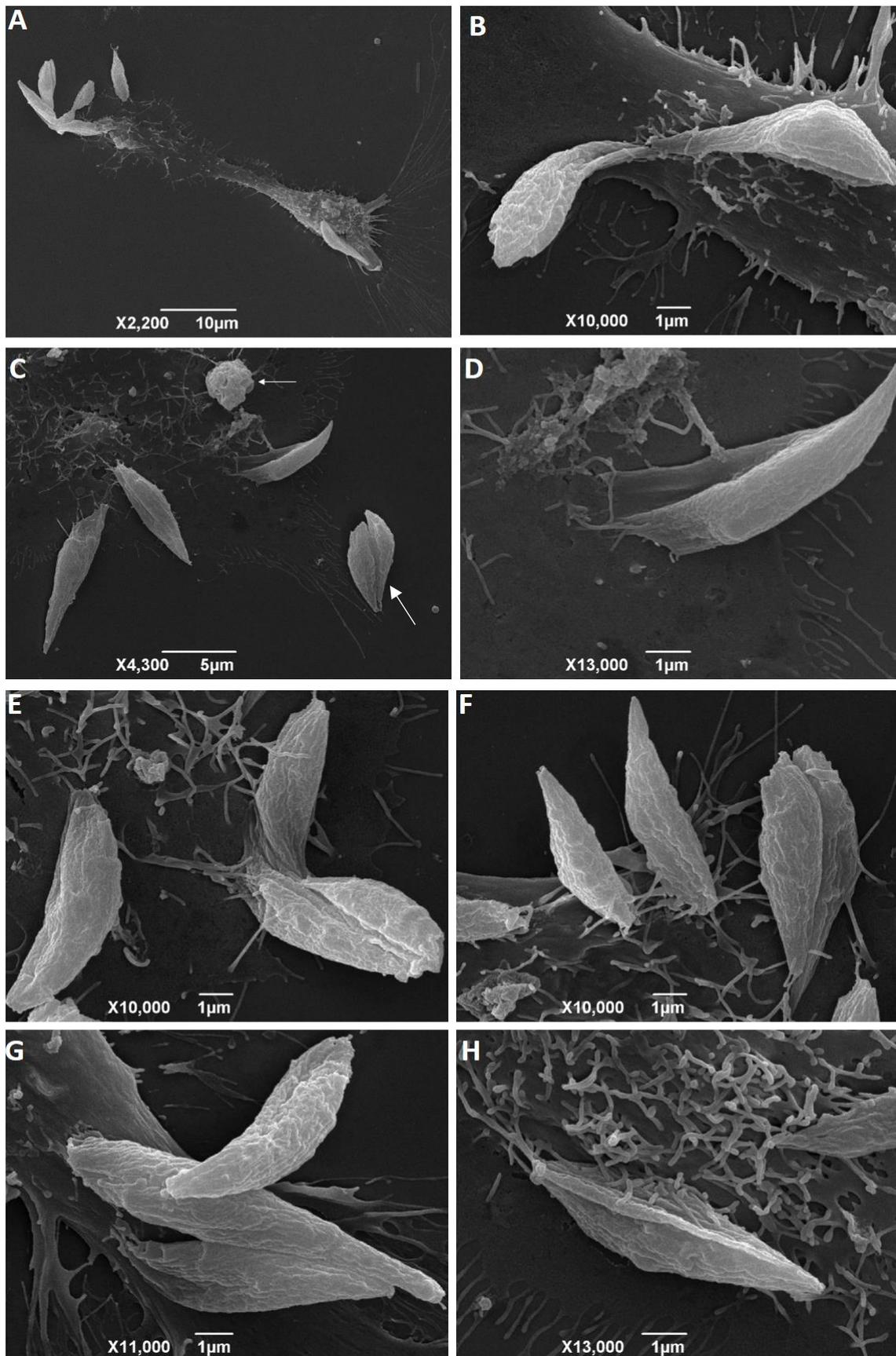


Figura 57: Interação entre *T. caninum* e Mφ no tempo de 2 horas em condição com meio suplementado com BSA por MEV. A e B: adesão de epimastigota aflagelar na célula; C: destaque da amastigota em interação com Mφ e da divisão de EA; D-H: adesão em detalhes da forma EA com prolongamentos da célula;

6 horas de interação (TC- M ϕ)

No tempo de interação de 6 horas, com meio suplementado com SFB foi observado por MCC, epimastigotas aflagelares livres (Fig. 58 B e F), formas amastigotas livres (Fig. 58 A) e amastigotas intracelulares e em interação com macrófago (Fig. 58 A e C). Foi possível observar também no interior de um mesmo vacúolo mais de uma amastigota, sugerindo a divisão de amastigotas em vacúolos parasitóforos (Fig. 58 B e D). Outro evento, foi a presença de células com citoplasma fragmentado contendo inúmeras amastigotas, provavelmente sendo liberadas da célula (Fig. 58 E e F). Por MEV, foi observada adesão da forma epimastigota aflagelar e interação da forma amastigota com a célula (Fig. 60 A e B), amastigotas aglomeradas ou livres (Fig. 60 C), os aglomerados de amastigotas apresentavam-se dispostos por cima da célula ou a rompendo (Fig. 60 E e F). Também foi observado mudança de forma amastigota para epimastigota aflagelar (Fig. 60 D). Pela técnica de MET, foi observada amastigota no interior da célula em processo de degeneração (Fig. 62 A), adesão do parasito com detalhe do prolongamento da célula ancorando o parasito (Fig. 62 B, C e D) e também a presença de parasitos livres próximo a célula (Fig. 62 D).

A condição utilizando meio suplementado com BSA, apresentou interação similar a condição com meio suplementado com SFB. Durante a interação foi possível observar muitas células rompidas. Foram visualizadas amastigotas interiorizadas em células integras e em células rompidas (Fig. 59 A, E e F), amastigotas interiorizadas em vacúolos estreitos e em vacúolos maiores (Fig. 59 C e D) amastigotas interagindo com células com citoplasma fragmentado, amastigotas livres, aglomeradas com a célula e em mudança de forma para epimastigota aflagelar (Fig. 59 B, E e F). Por MEV, foi possível observar prolongamentos do M ϕ sendo projetados e envolvendo os parasitos (Fig. 61 A-D), interação de amastigota e prolongamentos realizados pelos M ϕ s (Fig. 61 H e I), parasitos em mudança da forma amastigota para epimastigota aflagelar (Fig. 61 E) e amastigota em processo de liberação da célula (Fig. 61 F, G e J). Pela técnica de MET, foi demonstrada adesão da forma epimastigota aflagelar e interiorização de várias amastigotas na mesma célula (Fig. 63 A e C) ou por prolongamentos que sustentam os parasitos durante o processo de entrada na célula (Fig. 63 E e F), amastigotas livres e em interação com a célula (Fig. 63 B),

interiorização de amastigotas com possível divisão dessas formas em vacúolo parasitóforo (Fig. 63C) e dentro de uma mesma célula presença de amastigota interiorizada em processo de digestão (Fig. 63 D).

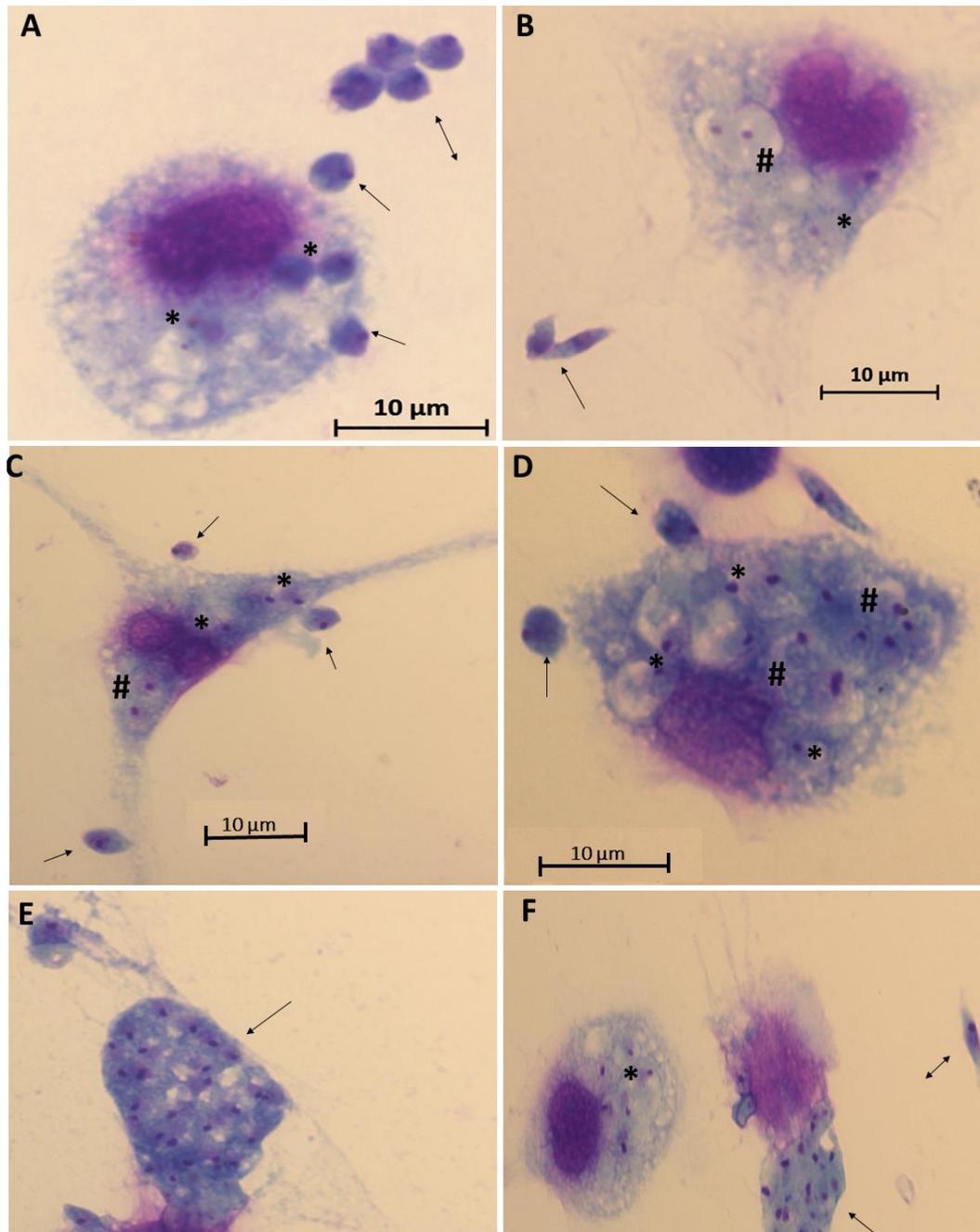


Figura 58: Interação entre *T. caninum*, no tempo de 6 horas em condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: amastigota interiorizada (*), interagindo com a célula (seta) e livre (seta dupla); **B:** Formas EAs livres (seta), amastigotas no mesmo vacúolo sugerindo uma divisão de amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo (#) e amastigota interiorizada (*); **C:** célula espalhadas com prolongamentos em interação com amastigotas (seta) e amastigota interiorizadas; **D:** amastigota livre e interagindo com a célula (seta), amastigotas interiorizadas em vacúolos individuais (*) ou compartilhados (#); **E:** célula desconstruída com citoplasma repletos de amastigotas se destacando do núcleo; **F:** Mφ contendo amastigotas interiorizadas (*), célula desconstruída com citoplasma separando-se do núcleo com inúmeras amastigotas (seta) e EA livre (seta dupla);

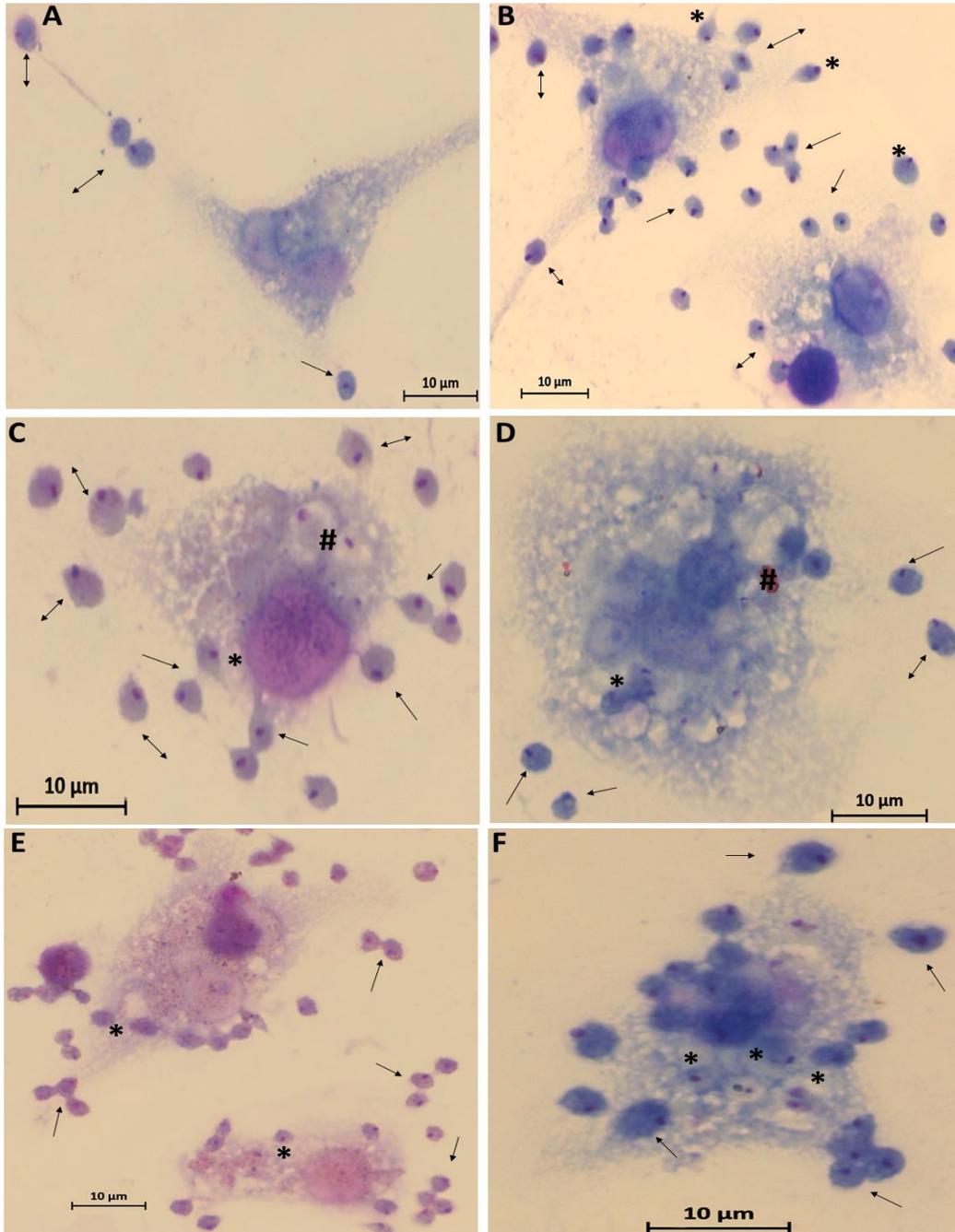


Figura 59: Interação entre *T. caninum* e Mφ, no tempo de 6 horas em condição com meio suplementado com BSA pela técnica de MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: célula em interação com amastigota (seta dupla) e amastigota livre (seta); **B:** células com citoplasma fragmentado com interação de amastigota (seta dupla), mudança de forma (*) e amastigotas livres (seta); **C e D:** célula com várias amastigotas interiorizadas em vacúolos apertados (*) e amastigota em um vacúolo maior (#), mudança da forma de amastigota para EA (seta dupla) e amastigotas livres (seta); **E e F:** célula destruída com amastigotas livres e aglomeradas (seta) e interiorização de amastigota (*);

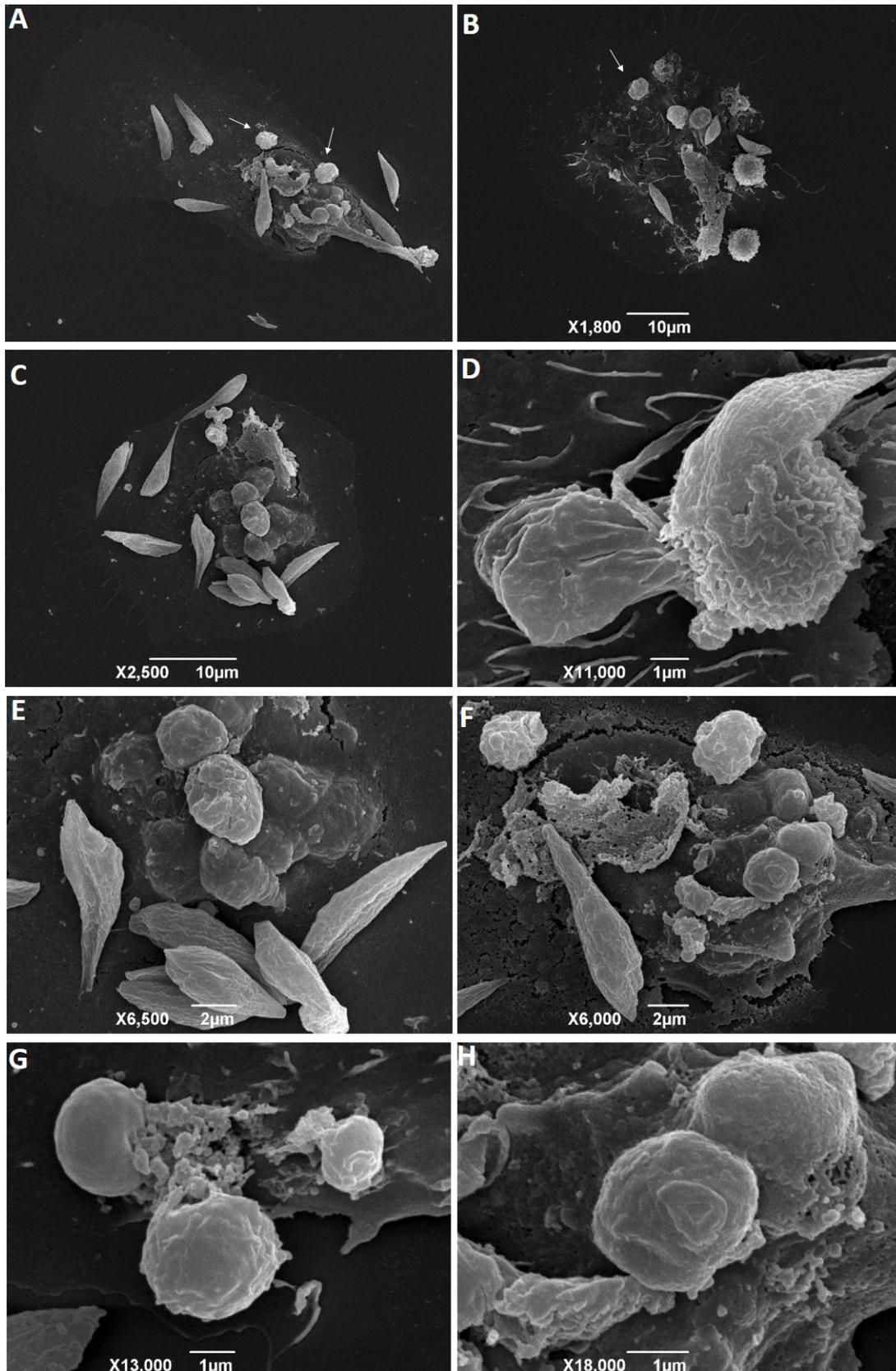


Figura 60: Interação entre *T. caninum* e Mφ no tempo de 6 horas em condição com meio suplementado com SFB por MEV. A, B e C: aglomerado de parasitos com adesão da forma (EA) e amastigotas ovoides; D: mudança de forma do parasito, de amastigota para EA; E e F: aglomerados de amastigota e EA; G-H: formas amastigotas em diferentes formatos, sugerindo mudança de forma evolutiva;

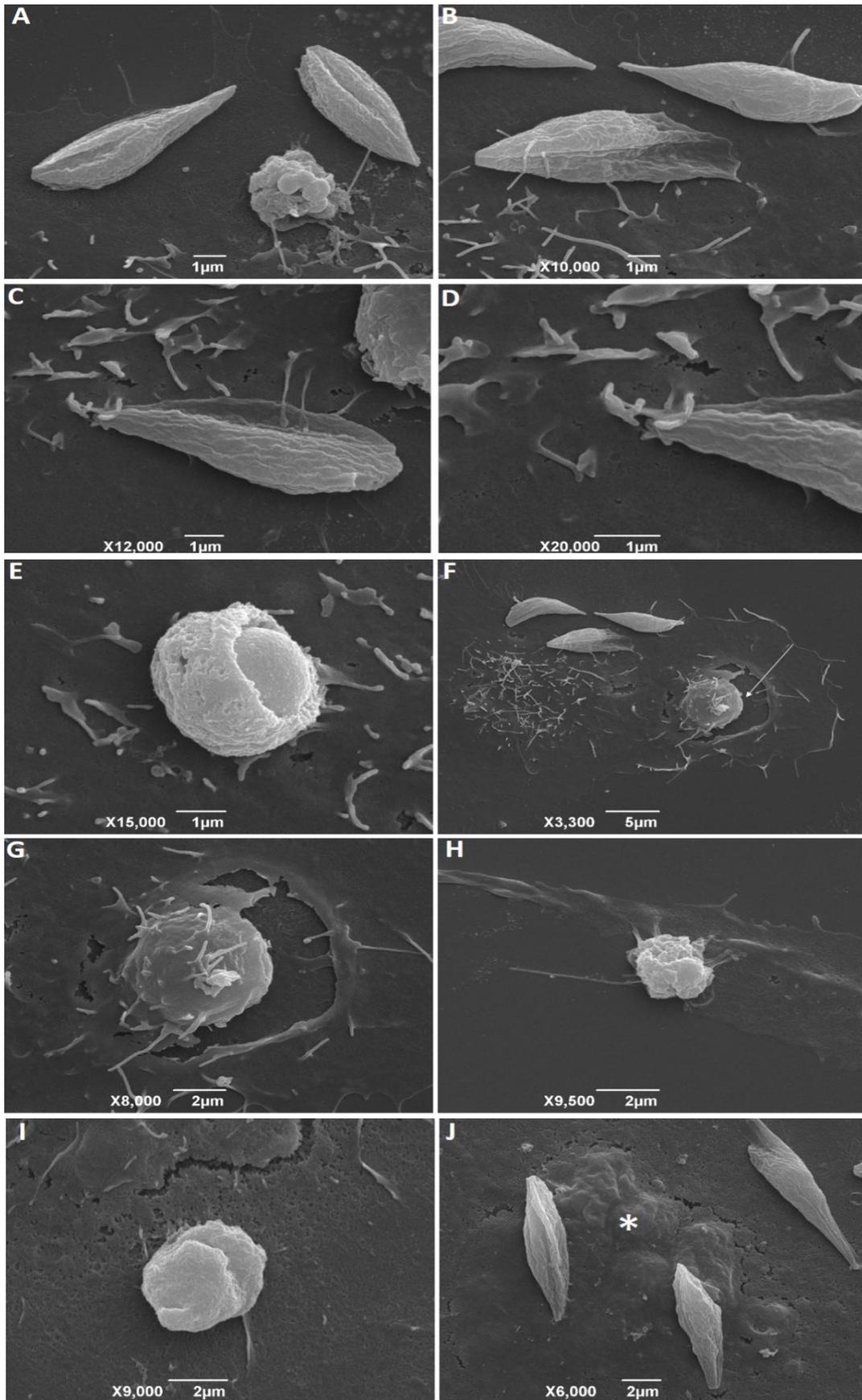


Figura 61: Interação entre *T. caninum* e Mφ no tempo de 6 horas em condição com meio suplementado com BSA por MEV. A: adesão de epimastigota aflagelar (EA) na célula; B: detalhes da adesão de EA; C e D: projeções celulares

da célula primária nos EAs; **E**: amastigota mudando de forma para EA; **F**: ruptura da célula com amastigota em destaque; **G**: detalhe da amastigota em interação com a célula rompida; **H** e **I**: interação de amastigota com suporte da projeção celular; **J**: em detalhe, protuberância do interior da célula sugerindo amastigotas por baixo da membrana do M ϕ ;

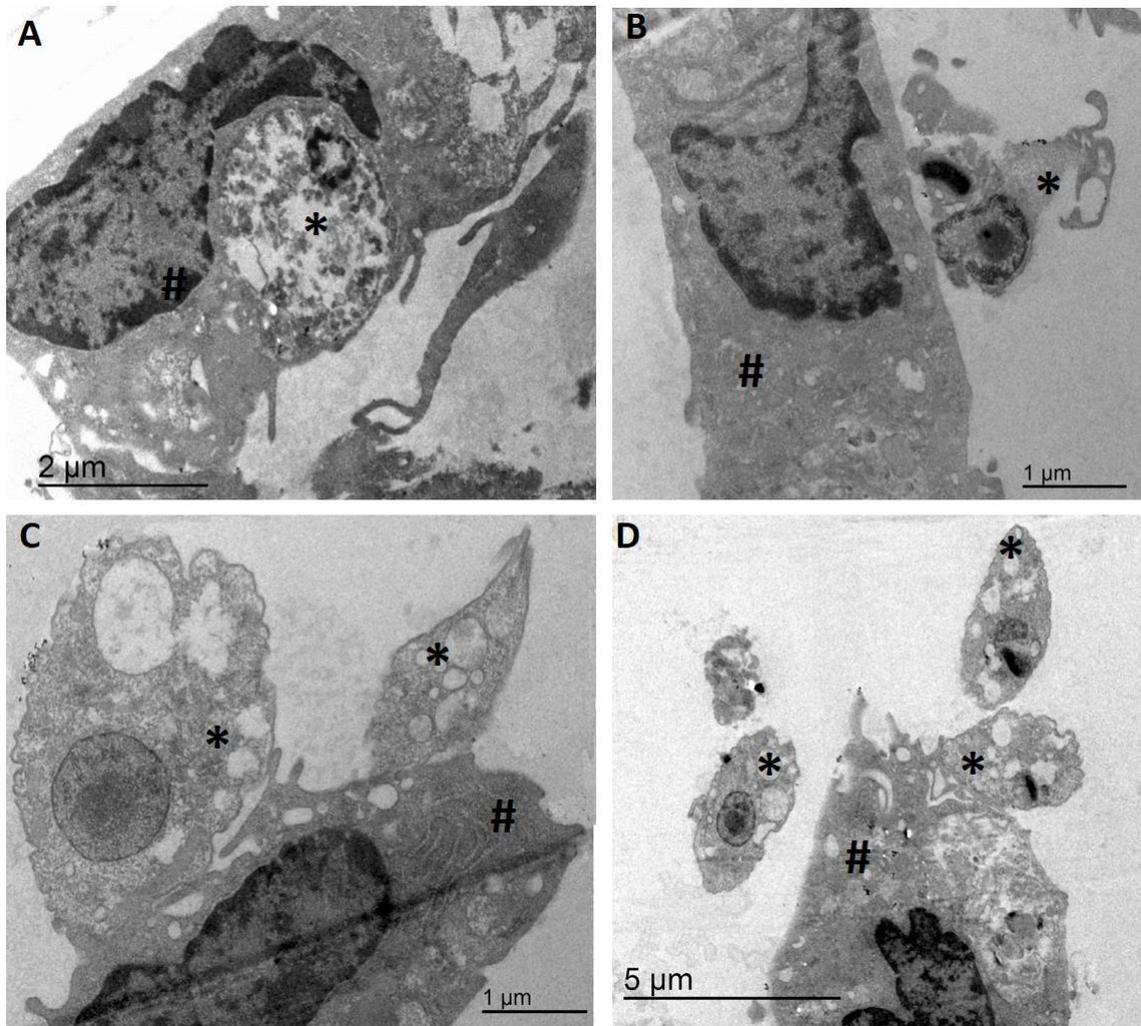


Figura 62: Interação entre M ϕ e *T. caninum* no tempo de 6 horas em condição com meio suplementado com SFB por MET. A: amastigota em degeneração(*); B: adesão do parasito de forma direta(*); C: adesão do parasito(*) com prolongamento da célula (#) ancorando o parasito; D: adesão e presença de parasitos livres (*);

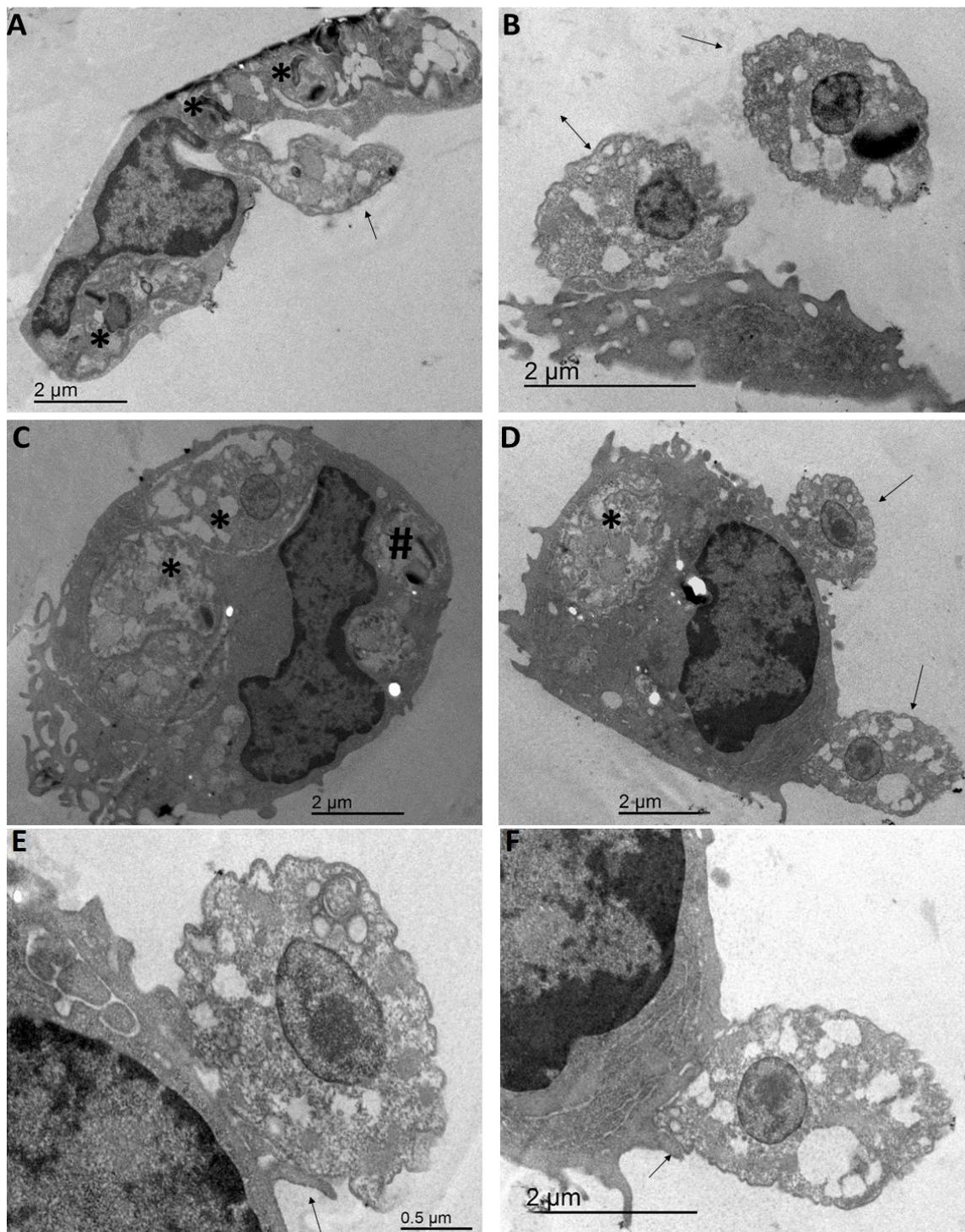


Figura 63: Interação entre Mφ e *T. caninum* no tempo de 6 horas em condição com meio suplementado com BSA por MET. A: parasito na forma epimastigota (EA) aderido à célula e endocitado dentro de vacúolo (*); **B:** amastigota livre (seta) e em interação com a célula (seta dupla); **C:** amastigota em divisão (*) e amastigota interiorizada (#); **D:** amastigota interiorizada (*), interação com amastigota e adesão de EA com a célula; **E e F:** detalhe da projeção da célula durante interação de amastigota e adesão de EA (seta);

24 horas de interação (TC- Mφ)

Nessa etapa da cinética, na condição com meio suplementado com SFB foi observado, por MCC, diminuição na adesão da forma epimastigota aflagelar com a célula e de epimastigota aflagelar livres (Fig. 64 B e D). Foram visualizadas amastigotas livres ou em interação com os macrófagos (Fig. 64 A-F, B), inúmeras amastigotas interiorizadas, algumas no mesmo vacúolo parasitóforo e amastigotas livres (Fig. 64 D e E). Foram observadas também células com citoplasma fragmentado e com liberação de amastigotas (Fig. 64 F). Por MEV na condição com SFB, foi possível observar divisão da forma epimastigota aflagelar (Fig. 66 A), interação entre amastigotas e célula (Fig. 66 B e C) e detalhe da projeção da célula em contato com a amastigota (Fig. 66 D). Pela técnica de MET foi observada a presença de amastigotas internalizadas em uma mesma célula (Fig. 68 A e B)

Na condição com meio suplementado com BSA foi observada menor multiplicação celular dos macrófagos nas lamínulas comparado na condição com SFB e também muito debris celular devido às células destruídas. Foram visualizadas amastigotas rompendo células (Fig. 65 A), epimastigotas aflagelares aderidas às células e ou livres (Fig. 65 A, C- F), interação e interiorização de amastigotas (Fig. 65 B - F) e parasito em divisão (Fig. 65 D e E). Por MEV, na condição com BSA foi observado adesão de epimastigota aflagelar em contato direto com a célula ou por projeções da célula (Fig. 67 A, B e F) e interação entre a forma amastigota e a célula (Fig. 67 C). Foi observado também uma possível mudança de forma evolutiva do parasito, da forma amastigota para epimastigota aflagelar (Fig. 67 E) e divisão da forma epimastigota aflagelar (Fig. 67 D). Pela técnica de MET, foi possível visualizar parasitos endocitados (Fig. 69 A e B), a adesão de epimastigota aflagelar com o Mφ (Fig. 69 D) e também o parasito em sugestiva transição da forma evolutiva amastigota para epimastigota aflagelar interagindo com a célula (Fig. 69 C).

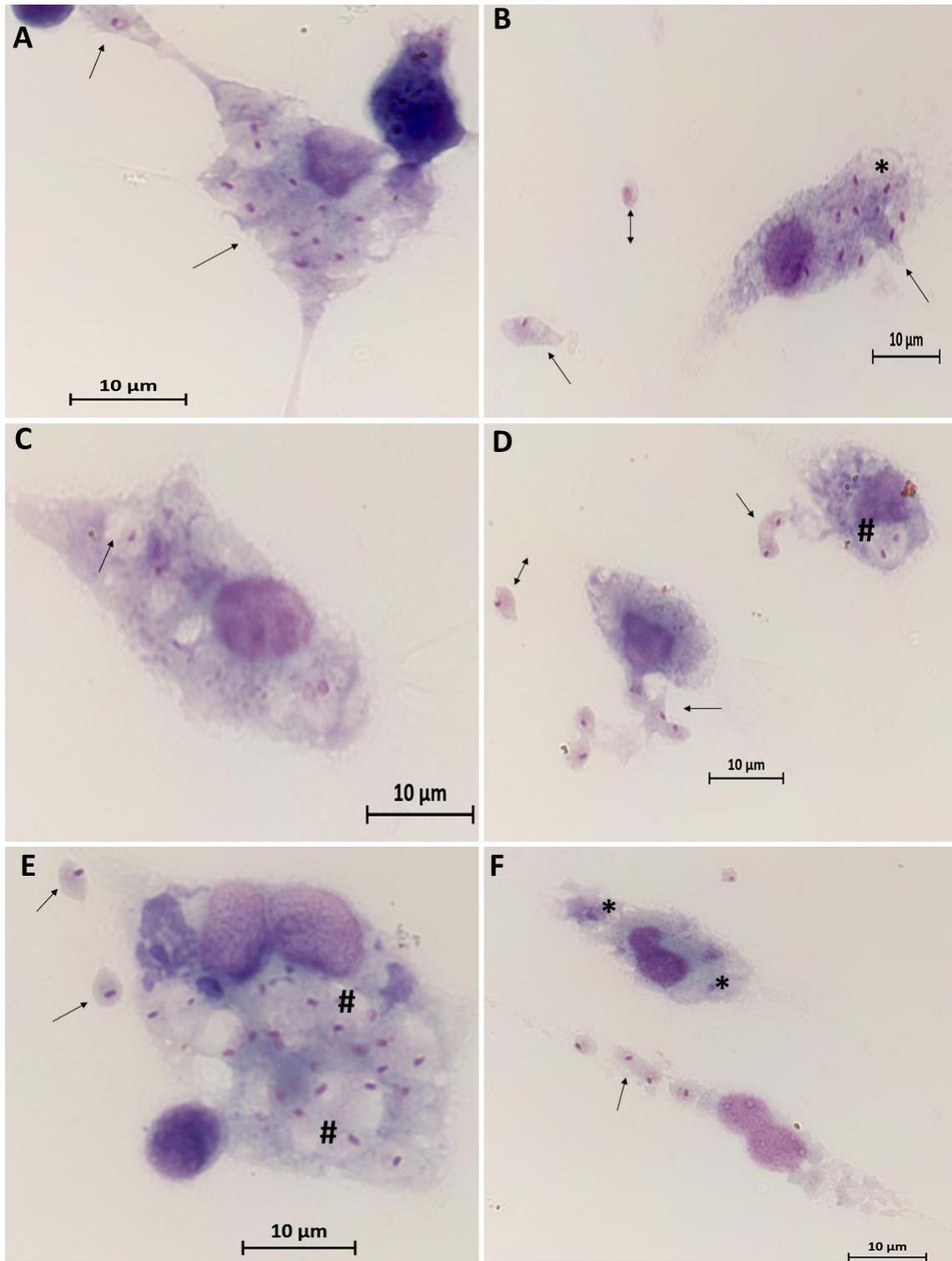


Figura 64: Interação entre *T. caninum* e M ϕ , no tempo de 24 horas em condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: amastigotas interiorizadas; B: amastigotas e epimastigotas aflagelares (EA), livres (setas), célula com amastigotas interiorizadas (*); C: célula com vacúolos vazios e com vacúolo contendo amastigota; D: célula com duas amastigotas dentro do mesmo vacúolo parasitóforo (#), parasitos sugerindo mudança de forma amastigota para EA (seta) sugere a evasão de parasitos da célula; E: inúmeras amastigotas interiorizadas algumas no mesmo vacúolo parasitóforo (#) e amastigotas livres (setas); F: na célula amastigotas interiorizadas (*) e célula com núcleo descontinuado e citoplasma fragmentado com evasão de amastigotas (seta);

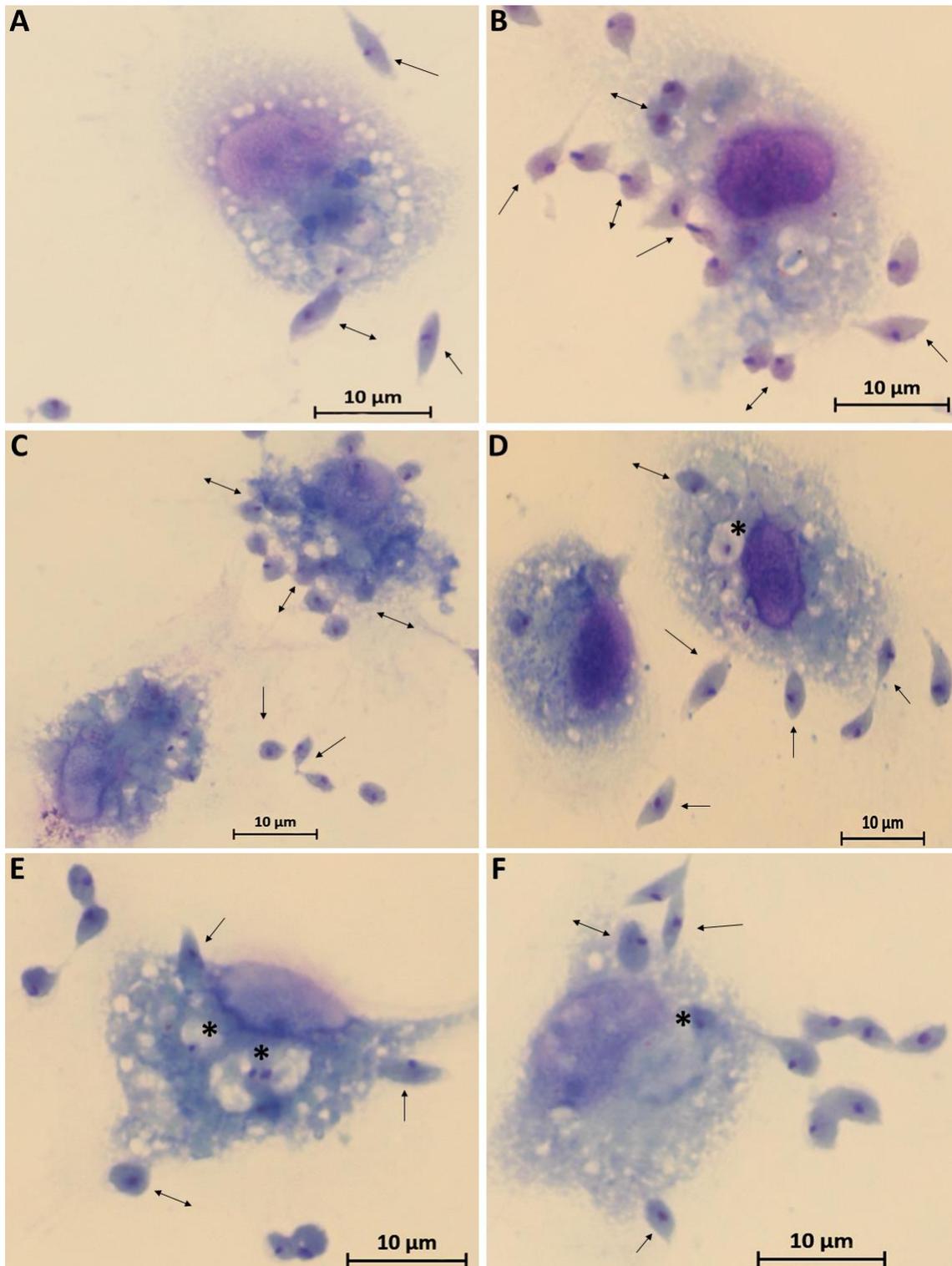


Figura 65: Interação entre *T. caninum* e Mφ, no tempo de 24 horas em condição com meio suplementado com BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: Forma epimastigota aflagelar (EA) livre (seta) e aderida à célula (seta dupla); **B e C:** interação entre amastigota e célula (seta dupla) e mudança de forma de amastigota para EA (seta); **D, E e F:** adesão de EA (seta), interação de amastigotas com a célula (seta dupla) e interiorização de amastigota (*);

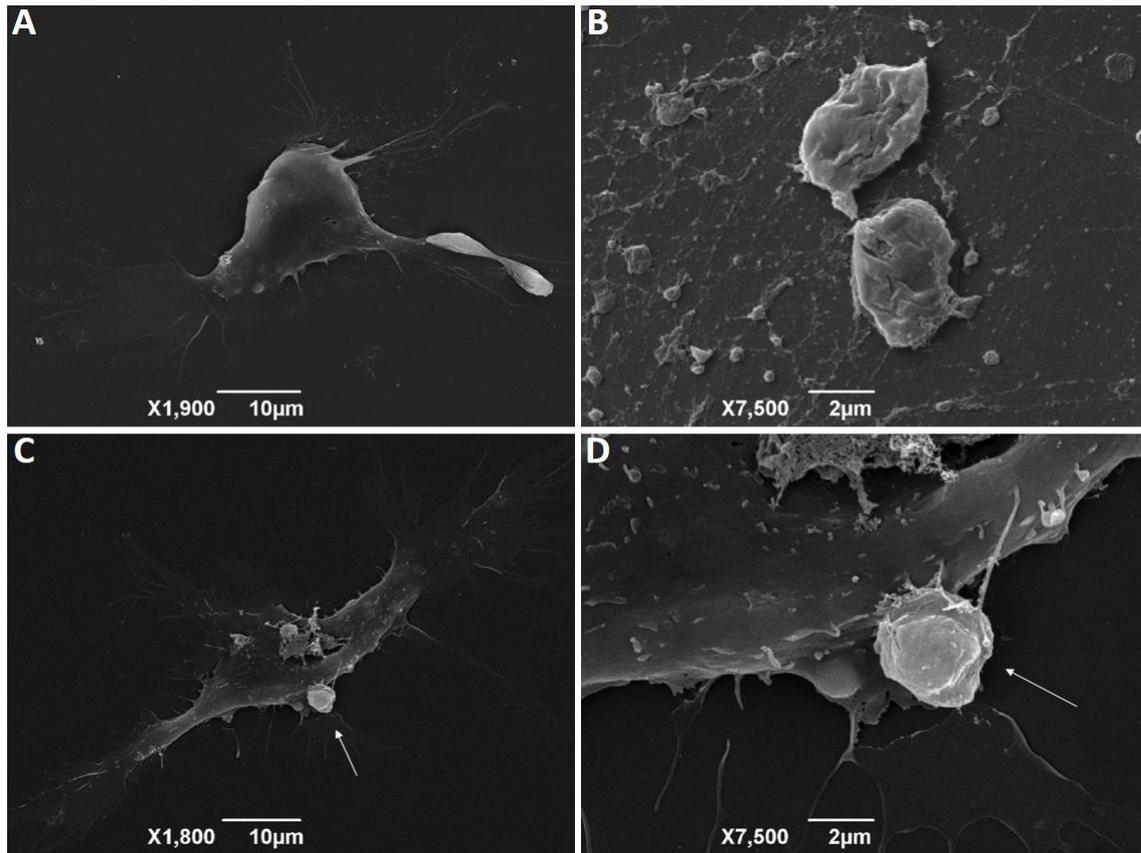


Figura 66: Interação entre *T. caninum* e Mφ no tempo de 24 horas em condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: divisão de parasito na forma epimastigota aflagelar (EA); B e C: amastigotas interagindo com a célula (seta); D: detalhe do prolongamento da célula projetada na amastigota (seta);

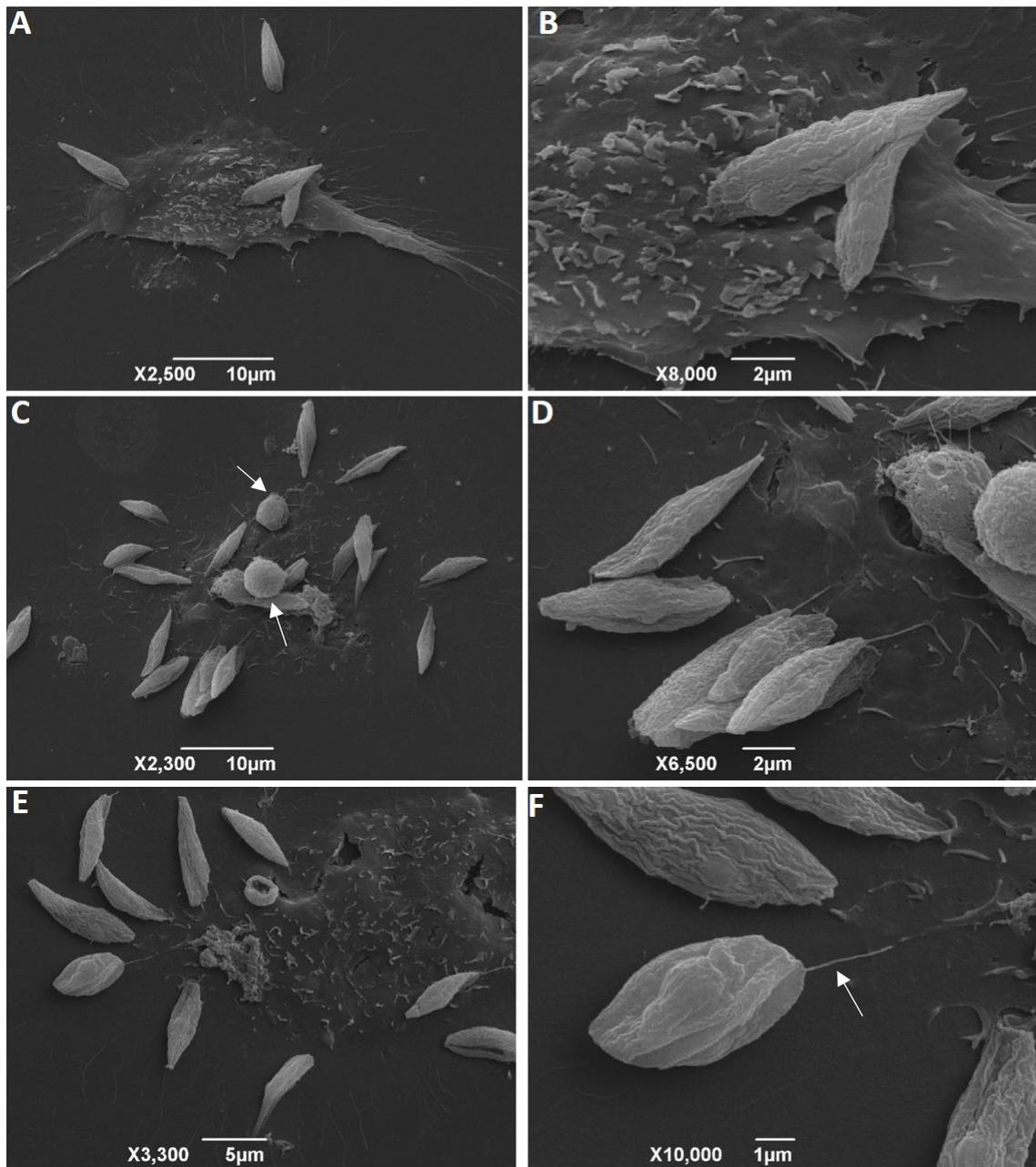


Figura 67: Interação entre *T. caninum* e Mφ no tempo de 24 horas em condição com meio suplementado com BSA por MEV. A e B: Formas epimastigotas aflagelares (EA) aderidas às células; C: aglomerado de parasitos na forma EA e amastigotas; D e E: adesão de vários parasitos nas células; F: projeção celular em contato com o parasito;

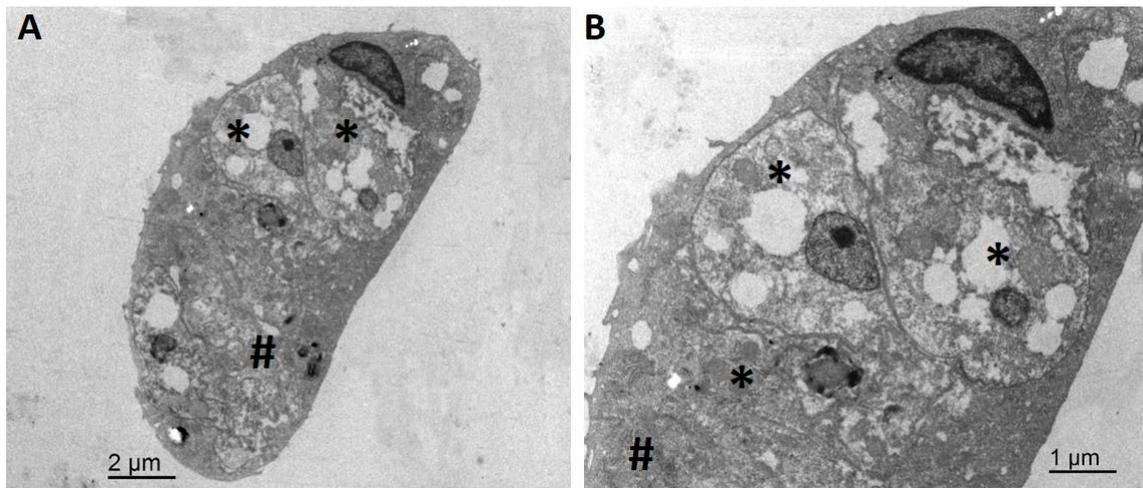


Figura 68: Interação entre Mφ e *T. caninum* no tempo de 24 horas em condição meio suplementado com SFB por MET. A: parasitos endocitados; B: detalhe de parasitos endocitados;

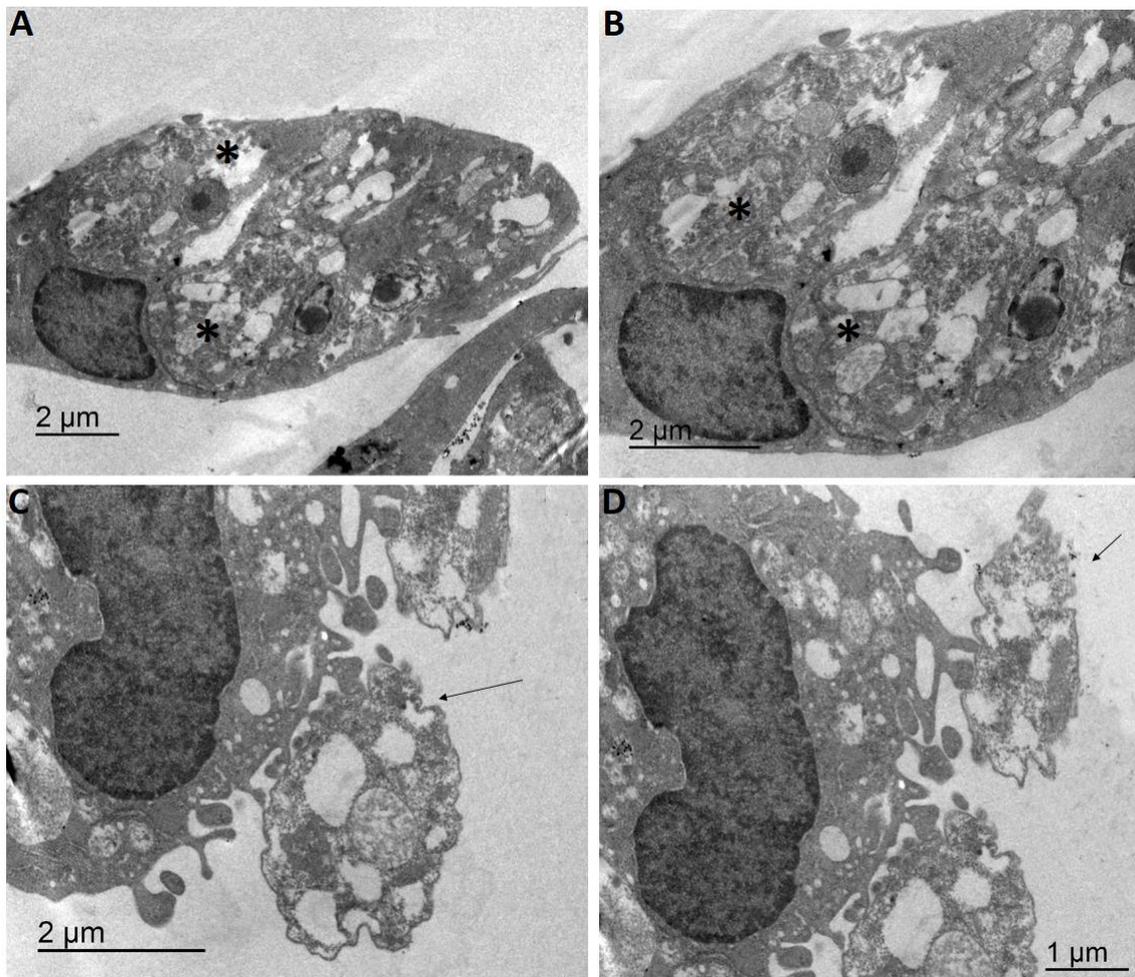


Figura 69: Interação entre Mφ e *T. caninum* no tempo de 24 horas em condição com meio suplementado com BSA por MET. A: amastigotas endocitadas; B: detalhe dos parasitos interiorizados; C: detalhe parasito interagindo com a célula, sugestivo de transição de amastigota para EA; D: parasito aderido na célula;

48 horas de interação (TC- Mφ)

Na análise do tempo de 48 horas de interação, na condição com meio suplementado com SFB foi observada, por MCC, a presença de amastigotas em interação com a célula e interiorizadas em células em vários tipos de conformação diferentes (Fig. 70 A, B e C). Foi observado também, célula com citoplasma fragmentado com amastigotas em mudança de forma para epimastigota aflagelar (Fig. 70 D e F) bem, como a presença de células integras com amastigotas livres em sua proximidade (Fig. 70 E). Havia raras formas epimastigotas aflagelares livres na lamínula. Pela técnica de MEV foi observada forma epimastigota aflagelar em aglomerados e aderidos por diferentes partes do corpo diretamente nos Mφs (Fig. 72 A) ou por prolongamento da célula (Fig. 72 D e E). Foi possível observar também amastigota interagindo com a célula (Fig. 72 H- J) e em mudança para a forma epimastigota aflagelar (Fig. 72 A, B, C, F e G).

A interação com meio suplementado com BSA apresentou perfil bem semelhante à utilizando SFB, demonstrando intensa interação entre amastigota e célula (Fig. 71 A - C), formas amastigotas interiorizadas (Fig. 71 D), livres e aglomeradas (Fig. 71 E-F), raras formas epimastigotas aflagelares livres. Por MEV, foi observada intensa adesão de epimastigota aflagelar à célula e interação entre amastigota e células (Fig. 73 A e E). Foi visualizada forma epimastigota aflagelar em divisão (Fig. 73 C e D) e também parasito em mudança de forma evolutiva amastigota para epimastigota aflagelar (Fig. 73 B). Foi possível observar também células apresentavam em sua membrana protuberâncias sugestivas de amastigotas interiorizadas (Fig. 73 F).

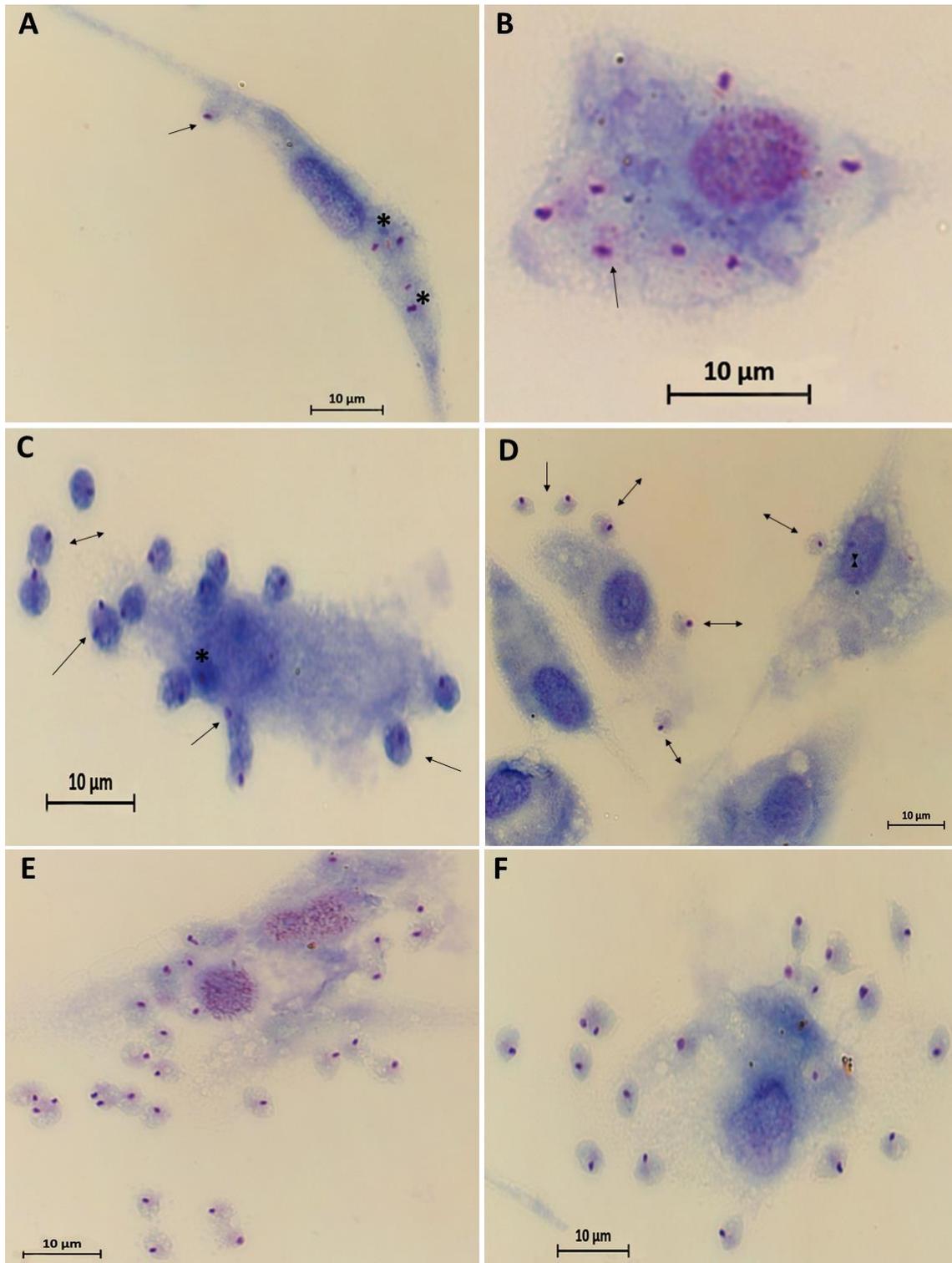


Figura 70: Interação entre *T. caninum* e Mφ, no tempo de 48 horas em condição com meio suplementado com SFB por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: interação com a célula (seta) e interiorização de amastigotas (*) na célula; **B:** amastigotas interiorizadas em célula com citoplasma fragmentado; **C:** amastigotas livres (seta dupla), interiorizada (*) e em interação com a célula (setas); **D:** células em interação com amastigota (seta dupla) e amastigotas livres (seta); **E e F:** célula com citoplasma rompido com liberação de amastigotas;

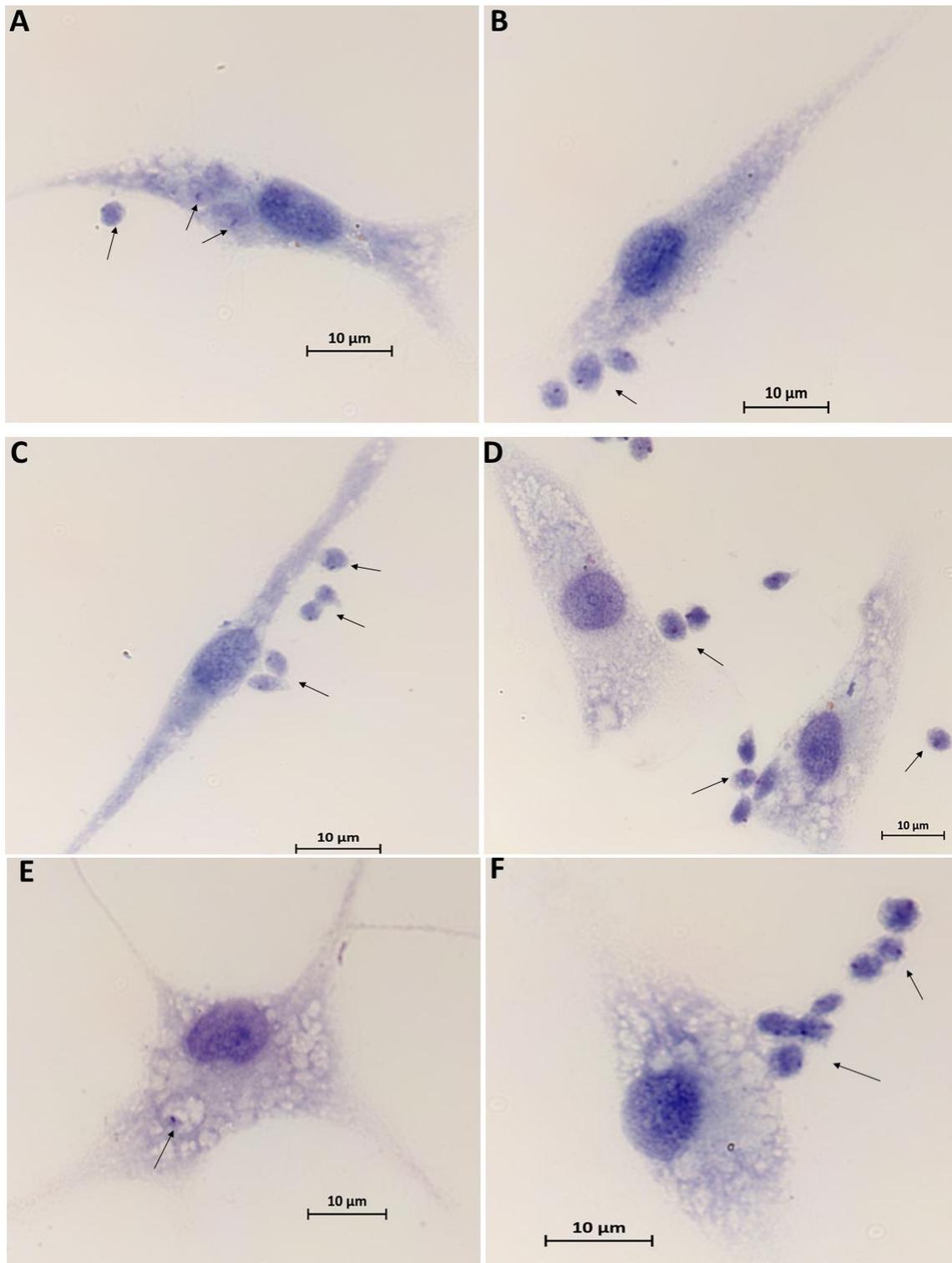


Figura 71: Interação entre *T. caninum* e Mφ, no tempo de 48 horas em condição com meio suplementado com BSA por MCC. Coloração por Giemsa, aumento 1000x. A: interação com a célula (seta) e interiorização (*) de amastigotas na célula; **B:** amastigotas interiorizadas em célula com citoplasma irregular; **C e D:** amastigotas livres e em interação com a célula; **E:** célula com citoplasma vacuolizado e amastigotas evadindo (seta); **F:** célula vacuolizada com liberação de amastigotas;

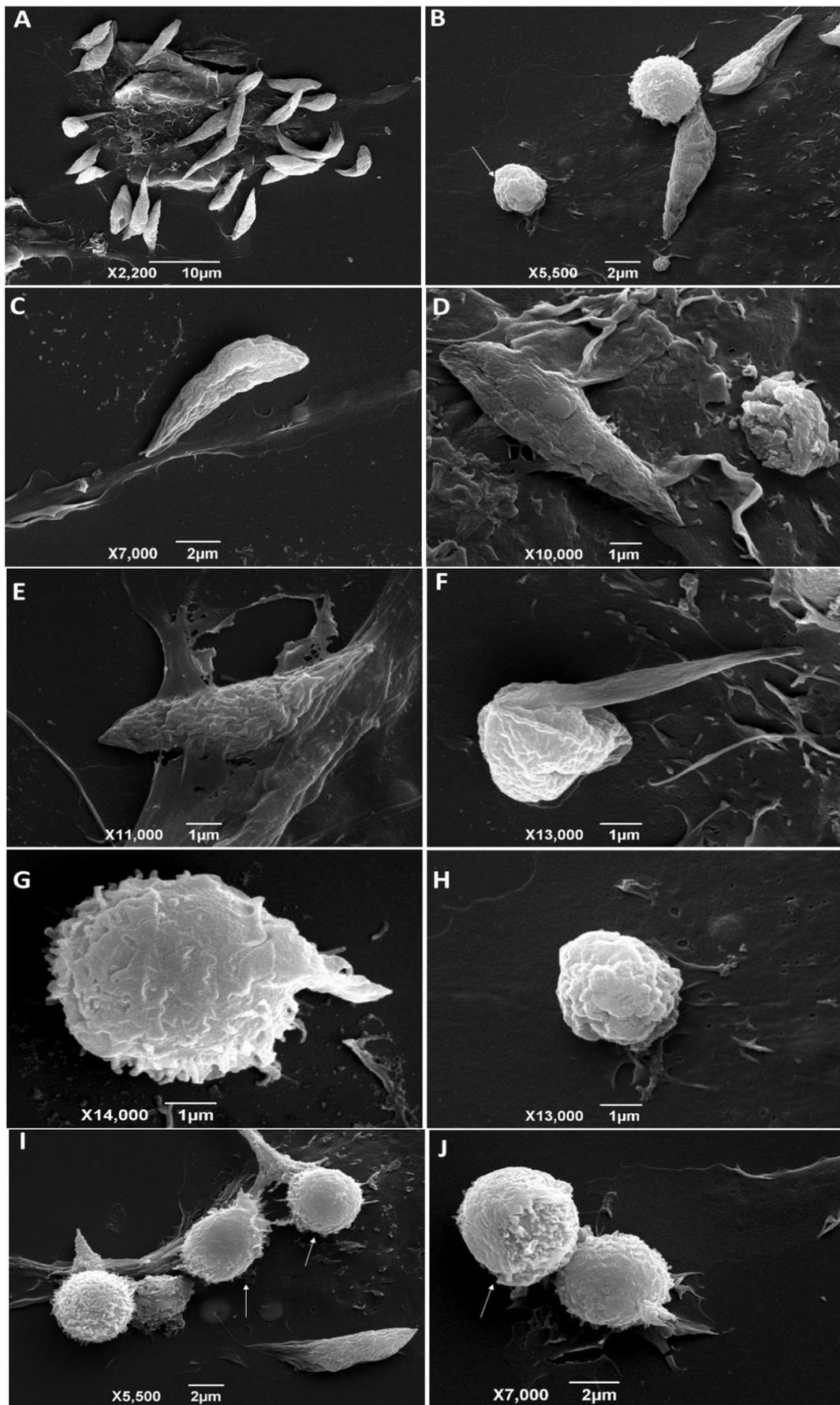


Figura 72: Interação entre *T. caninum* e Mφ no tempo de 48 horas na condição com meio suplementado com SFB por MEV. A: aglomerado de

parasitos e forma epimastigota aflagelar (EA) em adesão com a célula; **B**: interação da célula com amastigota; **C**: EA aderido à célula; **D**: EA aderida à célula sob projeções do macrófago, amastigota interagindo com a célula sugerindo mudança de forma; **E**: EA recoberta por projeção da célula; **F e G**: amastigota em mudança de forma para EA; **H**: amastigota irregular sugerindo mudança de forma; **I e J**: detalhe da interação entre amastigotas;

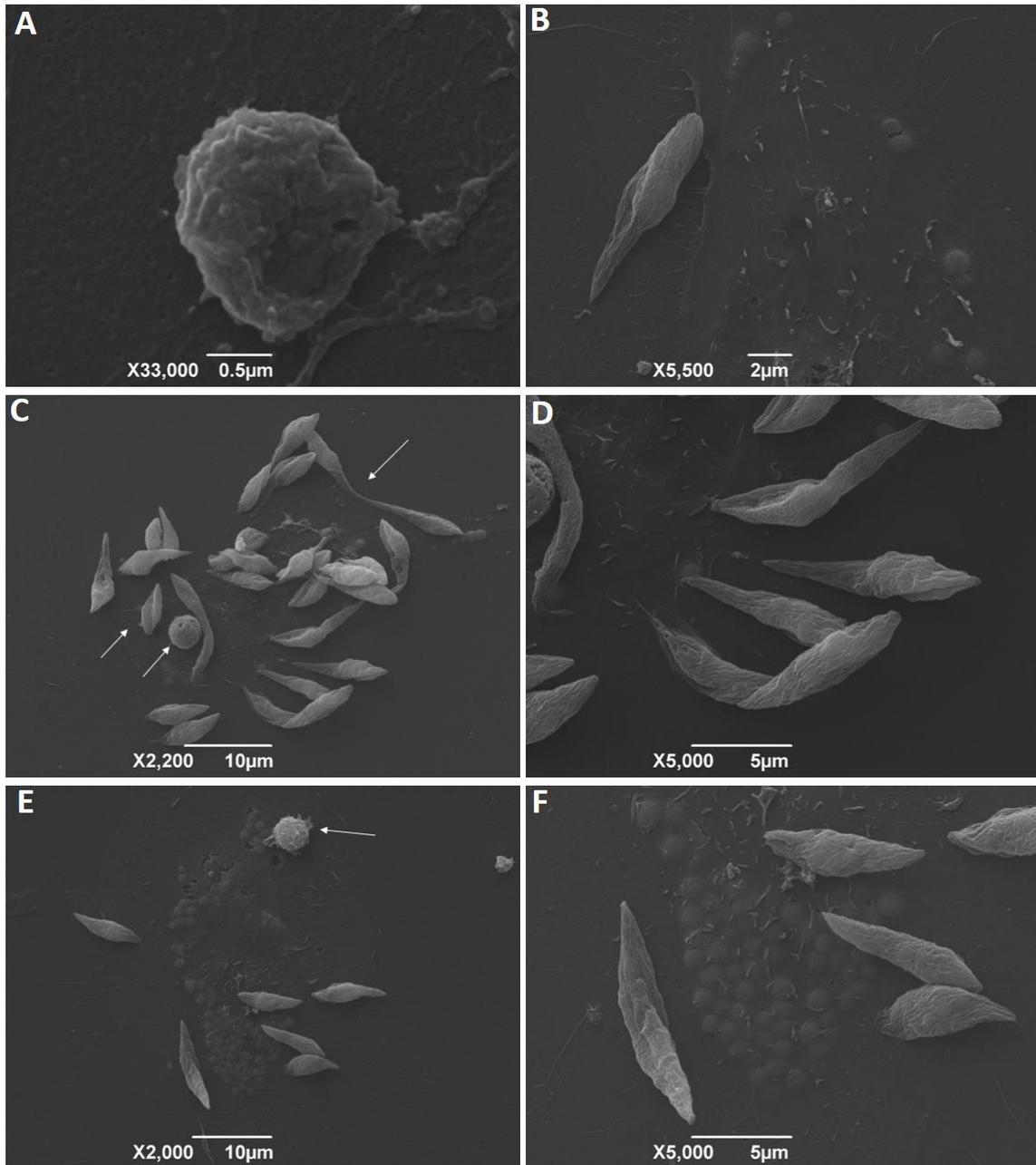
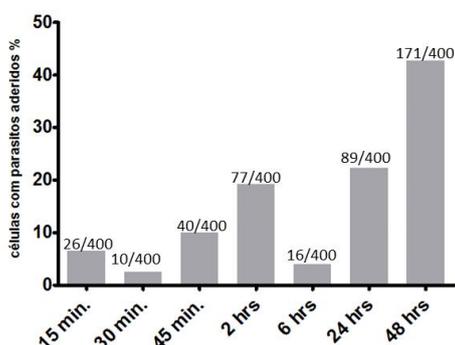


Figura 73: Interação entre *T. caninum* e Mφ, no tempo de 48 horas em condição com meio suplementado com BSA por MEV. A: interação de amastigota; **B:** parasito em mudança de forma; **C e D:** parasito na forma amastigota interagindo com a célula, EA aderidos à célula e divisão de parasito; **E:** amastigota interagido com a célula; **F:** parasitos aderidos em célula com estruturas arredondadas;

4.4.5 Análise das taxas de infecção e adesão entre *T. caninum* e macrófago peritoneal

As taxas de adesão (gráfico 7) de *T. caninum* ao macrófago peritoneal e a taxa de infecção (gráfico 8), foram calculadas a partir de contagem aleatória de 200 células em duas lamínulas, contabilizando um total de 400 células por cada tempo de cada experimento.

Taxa de adesão Macrófago + *T.caninum* (SFB)



Taxa de adesão Macrófago+ *T.caninum* (BSA)

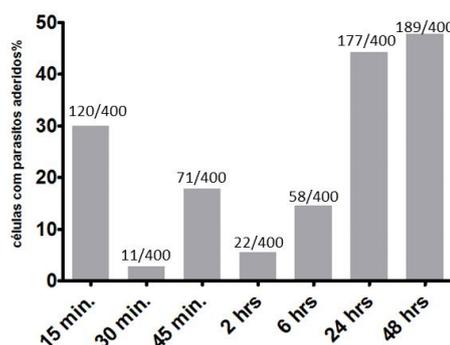
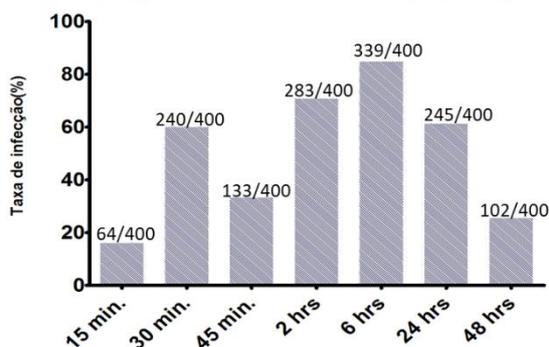


Gráfico 7 : Taxa de adesão de *T. caninum* em interação com Mφ. A: condição com SFB; B: condição com BSA;

Macrófago Peritoneal + *T.caninum* (SFB)



Macrófago Peritoneal + *T.caninum* (BSA)

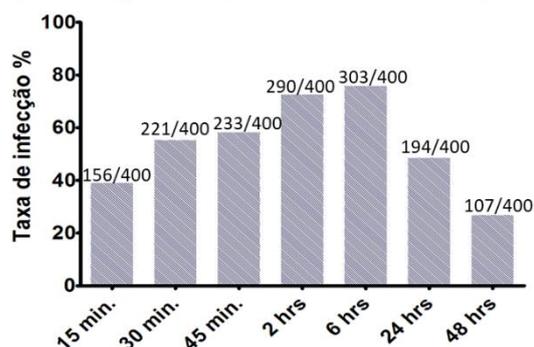


Gráfico 8 : Taxa de infecção da interação entre *T. caninum* e Mφ. A: interação realizada com meio de cultura suplementado com SFB; B: interação realizada com meio de cultura suplementado com BSA;

Esquema da interação entre *T. caninum* e células macrofágicas

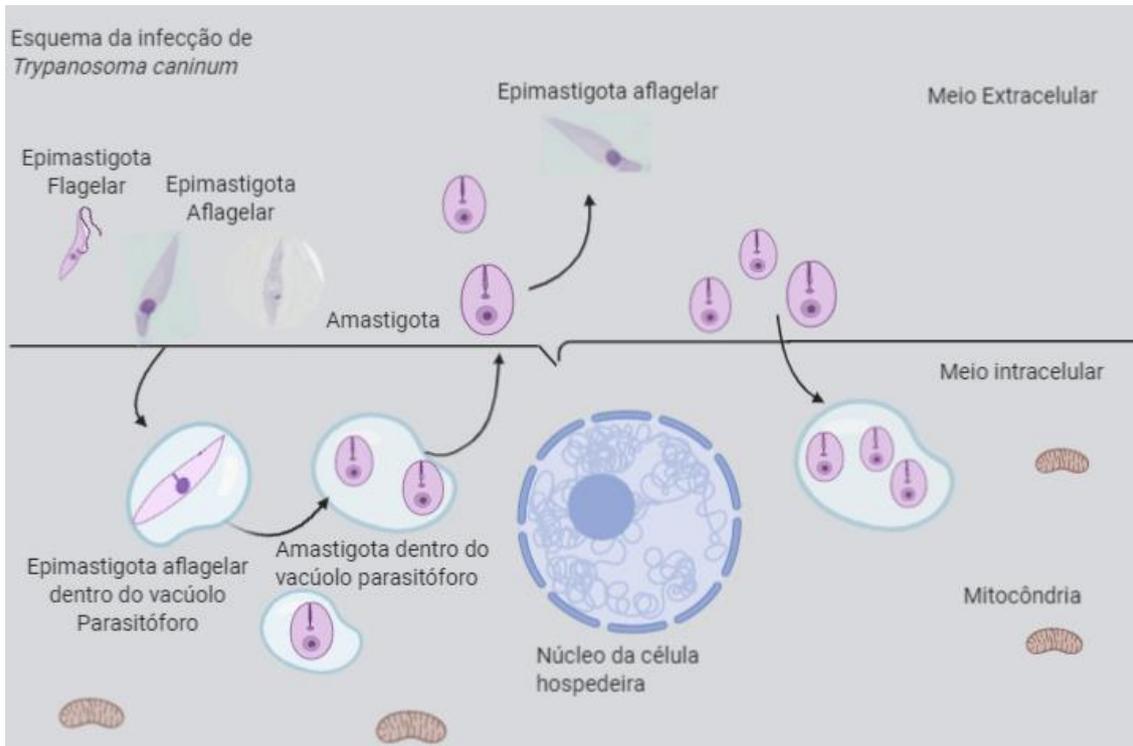


Figura 74: Esquema da infecção de *T. caninum* em células macrofágicas. As formas epimastigotas aflagelares aderem à célula seja por prolongamentos realizados pelo macrófago, ou de forma ativa, conseguem entrar na célula e no meio intracelular ficam em vacúolos parasitóforos apertados. Dentro desses vacúolos ocorre a mudança da forma epimastigota aflagelar para amastigota e essas amastigotas se multiplicam nesses vacúolos. Logo após, as amastigotas rompem a célula e no meio extracelular se diferenciam em epimastigotas aflagelares ou interagem com a célula novamente em um novo processo de infecção. Todo o processo ocorre em 15 minutos. Ao longo do tempo, o vacúolo se apresenta maior e várias amastigotas são visualizadas em seu interior (a partir do tempo de 6 horas). No tempo de 48 horas as células estão bastantes rompidas, no entanto, nas células íntegras ocorre uma maior adesão de epimastigota aflagelar dando início à um novo ciclo de infecção;

4.6 Análise estatística

Foi realizado o teste estatístico Anova na comparação entre o experimento da interação de *T. caninum* com a linhagem celular DH82 e com macrófagos peritoneais, após a realização dos testes de normalidade, homogeneidade e autocorrelação nos quais as propostas foram aceitas. Foi identificado que não houve diferenças estatísticas significativas na quantidade

de parasitos aderidos as células quando comparados os dois tipos celulares (p-valor 0.498993), mas houve diferença significativa quando comparados os dois tipos de suplementos do meio de cultura (BSA e SFB) (p-valor 0.006241) e em relação aos 7 tempos empregados em cada experimento (p-valor 0.000607).

Também foi verificado que existe diferença significativa no número de células infectadas entre as células macrófágicas (p-valor 1.93e-14). Também quando comparados os dois tipos de suplementos de meio de cultura (p-valor 0.0157) e em relação aos 7 tempos de cada de experimento (p-valor 1.82e-09).

Também foi analisado se havia diferenças simultaneamente na quantidade de parasitos aderidos e células infectadas. Na comparação entre as duas células, o teste Anova apontou diferença significativa (p-valor 0.000333), bem como nos dois tipos de suplementação do meio de cultura (p-valor 0.001002) e nos tempos da cinética de cada experimento (p-valor 0.003888).

Em relação aos dados referentes a quantidade de parasitos interiorizados nas células, houve diferença quando comparados os dois tipos celulares (p-valor 1.98e-12) e entre os 7 tempos de cada experimento (p-valor 1.88e-06), mas não houve diferença quando comparados os dois tipos de suplementação (p-valor 0.309).

O Test-T apontou maior média na interação entre *T. caninum* e macrófago peritoneal do que na interação *T. caninum* - DH82 (tabela 3) independente do meio de cultura suplementado com SFB ou BSA. Quando comparado os dois tipos de suplementação, o meio suplementado com BSA apontou as melhores médias em comparação com o SFB quando utilizado nas duas células macrófágicas. De forma geral foi observada melhor combinação de médias na interação *T. caninum* - M ϕ quando utilizado a BSA como suplemento do meio de cultura.

Tabela 3: Resultado do Test-T na comparação entre os tipos celulares e tipos de suplementação do meio de cultura.

Tipo_sup	Tipo_cel	n	mean	sd
BSA	DH82	21	69,43	46,98
BSA	Macrófago	21	142,29	70,07
SFB	DH82	21	39,62	23,15
SFB	Macrófago	21	133,90	84,06

Quadro 2: Resumo das informações da interação entre *T. caninum* com a linhagem DH82 e com macrófago peritoneal murino nos tempos de 15, 30, 45 minutos e 2 horas.

Tempos	TC- DH82	TC-Mφ
15 minutos	<ul style="list-style-type: none"> - Formas epimastigota aflagelar (EA) aderidas nas células por diferentes partes do corpo celular; - Amastigotas interiorizadas e em interação com os prolongamentos das células; 	<ul style="list-style-type: none"> - Formas epimastigota aflagelar (EA) aderidas nas células; - Amastigotas livres, interiorizadas em vacúolos estreitos e/ou interação com a célula; - Amastigota em processo de transição de forma para EA;
30 minutos	<ul style="list-style-type: none"> - Células vacuolizadas com adesão de EA; - Interação da célula com amastigota; - Aglomerados semelhantes a ninhos de amastigotas; 	<ul style="list-style-type: none"> - Parasitos livres; - Células com citoplasma fragmentado; - EA aderida a célula; - Aglomerados de amastigotas; - Interação entre amastigota e célula; - Amastigotas em mudança para a forma EA;
45 minutos	<ul style="list-style-type: none"> - EAs livres, aderidas as células e em divisão; - Amastigota em interação com as células; - Microscopicamente maior quantidade de amastigotas interiorizadas e de amastigotas livres; - Mudança da forma amastigota para EA; 	<ul style="list-style-type: none"> - Células vacuolizadas e infectadas; - Adesão de EA; - Mudança de forma amastigota para EA; - Amastigotas livres estavam mais afiladas mais parecidas com a forma EA; - Amastigotas passando pelo processo de digestão, mas também havia amastigotas interiorizadas viáveis; - Divisão de amastigota dentro de vacúolo parasitóforo;
2 horas	<ul style="list-style-type: none"> - Muitas células alongadas e vacuolizadas e de maneira mais intensa; - Maior quantidade de EA; - Adesão de EA por diferentes partes do corpo parasitário; - Amastigotas interiorizadas, em interação com a célula e transição da forma amastigota para EA; 	<ul style="list-style-type: none"> - Intensa adesão por todas as partes do corpo da forma EA; - Adesão com intensa projeção de prolongamentos dos Mφs em torno do parasito; - Adesão sem a participação de prolongamentos; - Parasitos livres; - Amastigota interiorizada em células com formas arredondadas ou alongadas; - Presença de macrófagos com citoplasma fragmentado contendo parasitos interiorizados; - Amastigota em interação com a célula, interiorizada e livre; - Parasito em transição da forma amastigota para EA;

Quadro2: Resumo das informações da interação entre *T. caninum* com a linhagem DH82 e com macrófago peritoneal murino nos tempos de 6, 24 e 48 horas.

Tempos	TC- DH82	TC- Mφ
6 horas	<ul style="list-style-type: none"> - Adesão de EA, mas em menor intensidade do que amastigotas internalizadas; - Amastigotas livres e em interação com a célula; - Células com vacúolo parasitóforo com mais de uma amastigota sugerindo divisão de amastigotas; - Amastigotas sendo digeridas pelas células; - Amastigotas viáveis interiorizadas e livres; 	<ul style="list-style-type: none"> - Poucas células; - Células com citoplasma fragmentado contendo inúmeras amastigotas; - Adesão do parasito com detalhe do prolongamento da célula ancorando o parasito; - EA livres; - Formas amastigotas livres, intracelulares e em interação com Mφ; - Interior de um mesmo vacúolo com mais de uma amastigota, sugerindo a divisão de amastigotas em vacúolos parasitóforos; - Parasito em mudança de forma amastigota para EA;
24 horas	<ul style="list-style-type: none"> - Muitas células dispostas pelas lamínulas; - Muitas células com vacúolos abundantes; - Adesão de EA; - Presença de células vacuolizadas com amastigotas interiorizadas; - Amastigotas livres; -Microscopicamente mais amastigotas do que EAs; - Mudança da forma amastigota para EA; 	<ul style="list-style-type: none"> - Diminuição EA em adesão com a célula e livres; - Amastigotas livres ou em interação com Mφs; - Inúmeras amastigotas interiorizadas, algumas no mesmo vacúolo parasitóforo e outras livres; - Células com citoplasma fragmentado e com liberação de amastigotas; - Detalhe da projeção da célula em contato com a amastigota;
48 horas	<ul style="list-style-type: none"> - Muitas células com parasitos livres entre elas; - Adesão de EA; - Amastigotas interiorizadas e em interação com a célula com bastante frequência; - Aglomerados de amastigotas aparentemente se dispersando das células; - Parasito em mudança de forma amastigota para EA; - Amastigotas interagindo com a célula em diferentes conformações, indicando mudança de forma; 	<ul style="list-style-type: none"> - Amastigotas em interação com a célula e interiorizadas em células em vários tipos de conformação diferentes; - Célula com citoplasma fragmentado com amastigotas em mudança de forma para EA; - Presença de células integras com amastigotas livres em sua proximidade; - EA aglomerados e aderidos por diferentes partes do corpo nos Mφs;

5. DISCUSSÃO

T. caninum é um parasito que ainda possui vários aspectos a serem respondidos, dentre elas, seu ciclo biológico, vetores e hospedeiros. No intuito de contribuir com informações sobre a biologia e obter informações do processo de infecção de *T. caninum* relacionado ao hospedeiro vertebrado, este estudo a partir de ensaios experimentais, visou avaliar *in vitro* a competência infectiva de formas epimastigotas aflageladas, cuja biologia ainda pouco se conhece.

Em cultivo axênico *T. caninum* apresenta predominância das formas evolutivas epimastigota flagelar e aflagelar, sendo raras as descrições de o encontro de formas tripomastigotas e esferomastigotas (Madeira et al. 2009; Barros 2013; Fonseca-Oliveira et al. 2018). Detalhes a nível ultraestrutural da forma epimastigota aflagelar de *T. caninum* foram descritos e estão presente nos isolados descritos desse parasito (Barros et al. 2014). Com objetivo de obter mais informações sobre a forma epimastigota aflagelar, foi selecionada para este estudo uma amostra de *T. caninum* com predominância de mais de 90% desta forma evolutiva. Além de *T. caninum*, outras espécies de tripanosomas, como *T. terrestris*, também apresentam em cultura axênica a forma epimastigota sem flagelo livre (Acosta 2013). É sabido que as epimastigotas desse gênero são pleomorfas, ou seja, há plasticidade da forma epimastigota, que passam por mudanças morfológicas durante desenvolvimento axênico (Peacock et al. 2018).

O uso do cocultivo de *T. caninum* com a linhagem celular DH82 demonstrou ser uma importante estratégia no estudo de diferenciação das formas evolutivas, como já demonstrado em estudos anteriores (Fonseca-Oliveira et al. 2018). A partir dessa interação, foi possível observar a presença de formas tripomastigotas e esferomastigotas, situação que no cultivo axênico não ocorre. No estudo de Fonseca-Oliveira et al. (2018) foi observado intensa diferenciação para formas tripomastigotas utilizando cocultivo de *T. caninum* com diferentes linhagens celulares. Tal estratégia (uso de cocultivo para diferenciação de formas evolutivas) tem sido descrito em diversos estudos desde a década de 1990, no qual foram realizados o cocultivo com a linhagem celular L929 para diferenciação das formas evolutivas de *Trypanosoma freitasi* até então conhecido pela sua dificuldade de manutenção (Thomas e Deane 1990).

A mesma estratégia de cocultivo foi empregada com *Trypanosoma KG1* em linhagens L929 ou HEK 293T (Thekisoet al. 2007).

Nos estudos envolvendo *T. cruzi*, sempre houve um consenso entre os pesquisadores de que apenas as formas evolutivas amastigotas e tripomastigotas seriam infectivas para o hospedeiro vertebrado, visto que a forma epimastigota seria reconhecida pelo sistema de defesa do hospedeiro mamífero, inviabilizando a infecção (Ley et al.1988; Gonçalves et al. 2018; Reignout et al. 2019). No entanto, estudos realizados por Kesler et al. 2017, comprovou que a forma epimastigota de *T. cruzi* também pode ser infectiva para hospedeiros vertebrados. Esse dado, nos impulsionou avaliar a capacidade infectiva de formas epimastigotas na interação entre *T. caninum* e células.

No perfil da curva de crescimento de *T. caninum*, tanto em meio axênico como em cocultivo com a linhagem celular DH82, foi possível observar ausência da fase lag, descrita como a fase inicial da curva de crescimento no qual o parasito passa por adaptação na condição de cultivo e quase não há crescimento parasitário (Buchanan 1918). Possivelmente, *T. caninum* é generalista no que se refere a nutrientes, logo entra na fase de crescimento exponencial, descrita por ocorrer intensa multiplicação parasitária, apresentando no cultivo axênico a forma epimastigota aflagelar e pequena porcentagem de epimastigota flagelar. Já no cocultivo apresentou as formas epimastigota flagelar, tripomastigota e esferomastigota (Tyler e Engman 2000).

Também foi observado, em ambas curvas de crescimento de *T. caninum*, ausência da fase estacionária, etapa em que ocorre diminuição de multiplicação dos parasitos devido a limitação de nutrientes e a produção de metabólitos tóxicos (Dos Santos et al. 2018; Tyler e Engman 2000). Esse estresse nutricional tem sido associado a indução do processo de metaciclogênese – mudança da forma epimastigota para tripomastigota (Gonçalves et al. 2018; Dos Santos et al. 2018; Tyler e Engman 2000). Em nosso estudo, a amostra de *T. caninum* aqui estudada não apresentou a forma tripomastigota ao longo da sua curva de crescimento em meio axênico e baixo percentual quando cocultivada com a linhagem celular DH82. Ambas curvas de crescimento seguiram imediatamente para a fase de declínio, possivelmente por escassez de nutrientes e/ou por acúmulo de restos metabólicos. Por outro lado, em curva de crescimento utilizando o meio NNN e outro isolado de *T. caninum* foi observada uma longa

fase estacionária (9^o ao 21^o dia) (Fonseca-Oliveira et al. 2018). Esses resultados demonstram que a curva de crescimento de *T. caninum* difere entre isolados e condições de cultivo.

A curva de crescimento de *T. caninum* em co-cultivo com a linhagem celular DH82 apresentou o mesmo perfil da descrita por Fonseca-Oliveira et al. (2018), porém com diferenças em relação a diferenciação das formas evolutivas: neste estudo foi encontrado 10% de formas tripomastigotas e Fonseca-Oliveira e colaboradores encontraram 60% dessas formas. Isso pode ter duas explicações, o fato de ter sido utilizado outro isolado de *T. caninum* e outra condição de cultivo (meio DMEM).

A análise ultraestrutural, realizada com formas evolutivas encontradas durante o cultivo axênico e em cocultivo com a linhagem celular DH82 de *T. caninum*, demonstrou a presença de estruturas comuns em parasitos da família Trypanosomatidae por exemplo cinetoplasto, microtúbulos subpeliculares, entre outros. Nas preparações de formas obtidas do cultivo axênico, no qual havia predominância de epimastigotas aflagelares, foram observados cortes do parasito com cinetoplasto ao lado núcleo, seguido da bolsa flagelar sem a presença do flagelo demonstrando, mais uma vez, particularidades desta forma atípica presente nos isolados de *T. caninum*, como descrito por Barros et al. (2014). Outra característica que nos chamou atenção, em ambas as formas epimastigostas (flageladas e aflageladas), foi a intensa presença de corpúsculos lipídicos, em diferentes tamanhos ao longo do corpo do parasito. Estudos com outros tripanosomatídeos demonstraram que essa estrutura está relacionada com a mudança da forma evolutiva, com a reserva nutricional do parasito e com a sua sobrevivência dentro da célula (De Souza 2009; Toledo et al. 2016). No entanto, estudos realizados em 2013 (Toledo 2013) e posteriormente em 2016 (Toledo et al. 2016), sugerem que a produção dessa estrutura pode facilitar a evasão de *T. cruzi* da célula, podendo estar envolvida na modulação da resposta imune do hospedeiro. Para saber qual o papel desses corpúsculos lipídicos tão abundantes em *T. caninum* será necessário realizar estudos, dentre eles a pesquisa do ácido araquidônico, encontrada em corpúsculos lipídicos, uma vez que seus derivados metabólicos são responsáveis pela produção dos eicosanoides, principalmente a enzima prostaglandina que é um regulador

inflamatório podendo inibir o sistema imune do hospedeiro (Bozza et al. 2011; Toledo 2013; Melo et al. 2011; D`Avila Levy et al. 2011).

A linhagem celular canina DH82 foi escolhida para os estudos experimentais de *T. caninum*, tanto para o cocultivo, quanto para a os estudos *in vitro* *T. caninum*-célula, por dois motivos: Primeiro por ser uma célula macrofágica e saber que esse tipo celular está envolvida no ciclo biológico de outros tripanosomatídeos (De Souza et al. 2010; Podinovskaia e Descoteaux 2015). O segundo motivo, por ser uma linhagem originária de cão, uma vez que o único hospedeiro conhecido, até o momento, é o cão. Esta linhagem já foi utilizada em diferentes estudos, dentre eles para demonstrar a multiplicação intracelular e prolongado período a infecção por *T. cruzi* (Mendonça et al. 2017). Também já foi utilizada em estudos com vírus (Zheng et al. 2020), de alergia (Herrmann et al. 2018) e bactérias (Michaels et al. 2016). Para comparar a interação de *T. caninum* em macrófago de origem primária com mais semelhanças fisiológicas com o tecido vivo do que a linhagem e por ser um modelo já utilizado a décadas, também foi empregado neste estudo macrófago peritoneal de camundongo, que exerce suas funções independentemente da espécie de mamífero e vem sendo utilizada como modelo de infecção *in vitro* por muitos anos para espécies do gênero *Trypanosoma* (Liston e Baker 1978; Russo et al. 1989; Da Rocha et al. 2019).

Neste estudo, foram obtidos dois resultados inéditos relacionados à biologia de *T. caninum*. Primeiro: foi demonstrado que as formas epimastigotas aflageladas são capazes de infectar ambas células macrofágicas. Segundo: demonstramos a presença de formas amastigotas de *T. caninum*, até então desconhecidas. Em trabalhos anteriores, avaliando a interação *T. caninum*-célula, não foi observada a infecção para o macrófago peritoneal de camundongo Swiss Webster e para a linhagem celular DH82 utilizando a forma evolutiva tripomastigota, diferente dessa dissertação na qual foi utilizado a forma epimastigota aflagelar (Madeira et al. 2009; Fonseca - Oliveira et al. 2018; Oliveira 2016). Esse dado é relevante uma vez que formas amastigotas nunca foram observadas em cortes histológicos de peles de cães naturalmente infectados (Makino et al. 2020).

Inicialmente, a cinética utilizada neste estudo foi baseada em trabalhos de infecção de células por tripanosomatídeos nos quais utilizaram tempos aproximados de 2, 6, 24, 48 e 72 horas (Ley et al. 1988; Calabrese et al. 2011; Cooper et al. 2018). No entanto, ao analisar os primeiros resultados, observamos que com 2 horas de interação, já havia interiorização do parasito na célula e a presença de amastigotas livres foi constante. Diante deste resultado, a cinética de observação foi realizada também para os tempos de 15, 30 e 45 minutos, na tentativa de conseguir observar os momentos iniciais dessa interação.

Na análise da interação entre *T. caninum* e ambas células macrofágicas, foi possível observar que no tempo inicial de 15 minutos já ocorria adesão da forma epimastigota aflagelar, presença de parasitos “arredondados” livres e amastigotas interiorizadas. Este evento foi uma surpresa, visto que espécies de tripanosomatídeos demoram mais tempo para infectar a célula. É descrito que na interação entre células da retina e *Leishmania amazonenses*, o parasito adere a célula na primeira hora de interação e interioriza após 6 horas (Calabrese et al. 2011). Em estudo de infecção entre *T. cruzi* e a linhagem celular DH82, foi descrito que somente após 5 dias ocorria a multiplicação intracelular (Mendonça et al. 2017). Um fato curioso, que chamou a nossa atenção, foi que logo no momento do inóculo de *T. caninum* nas placas com os macrófagos aderidos, observamos, em microscópio de campo claro invertido, aglomerados de parasitos locomovendo-se em direção às células. Apesar de ter sido inoculado quase que exclusivamente formas epimastigotas aflagelares, a ausência do flagelo não atrapalhou a locomoção dos parasitos até a célula.

Não foi observado um padrão na adesão de *T. caninum* em ambas as células empregadas. Foi observada adesão de *T. caninum* à célula tanto pela parte posterior, inferior e por todo o corpo do parasito. O mesmo foi observado por Uezato et al. (2005), que relatou que *Leishmania L. major* adere ao macrófago por diversas partes do corpo do parasito. Adicionalmente, Rittig et al. (1998) que realizaram estudos com promastigotas de *Leishmania* spp. e tripomastigotas de *T. cruzi*, observaram que a parte do corpo celular dos parasitas que se liga aos macrófagos variava dependendo das espécies do gênero. Durante a interação *T. caninum*-macrófago murinos, foram observadas nos tempos de 45 minutos e 2 horas, projeções da célula em torno do parasito, envolvendo-o completamente ou tocando alguma parte do corpo do parasito.

Também foram observadas por Uezato et al. (2005), as projeções realizadas pelo macrófago na adesão de *Leishmania major*. Apesar da DH82 realizar projeções de uma célula para outra mantendo uma intensa comunicação, não foi observada projeção celular em direção dos parasitos, sugerindo que *T. caninum* adere nessas células na tentativa de entrar na célula de forma ativa. Este fato também foi observado na interação com macrófago murino com menor incidência quando comparado com a linhagem celular DH82 neste estudo. Ambos os tipos de entrada na célula: ativa e por projeções celulares foram possíveis. Este evento já foi descrito na interação *T. cruzi*-macrófago por diversos autores (De Souza e De Carvalho 2013; Barrias et al. 2012; De Souza et al. 2010).

Outro fato interessante foi o conhecimento da forma epimastigota aflagelar de *T. caninum* ser infectiva para células de mamífero em condições experimentais. Isso nos leva a pensar na possibilidade de ser uma estratégia do parasito, visto que não haveria necessidade de gasto energético para se diferenciar na forma tripomastigota. Isso significa que *T. caninum* é um parasito com muitas chances de infectar – do mesmo modo que *T. cruzi*, no qual todas as formas são infectivas. No entanto *T. cruzi* tem centenas de espécies de mamíferos hospedeiros e *T. caninum* só o cão (até agora). O fato de, em experimentos *in vitro*, a forma epimastigota de *T. cruzi* infectar macrófagos de camundongos, corrobora esse resultado (Kesller et al. 2017). No entanto, são necessários estudos *in vivo* para obter informações e confirmar qual forma infectiva de *T. caninum* está envolvida no ciclo biológico no hospedeiro vertebrado.

Durante toda a cinética deste estudo, foram observadas amastigotas livres interagindo com as células. No primeiro momento em que foi observado amastigotas em contato íntimo com as células, levou-se a pensar que as amastigotas liberadas eram fruto do rompimento da célula hospedeira. No entanto, pelas técnicas de MEV e MET foi possível indicar tanto evasão quanto invasão da forma amastigota de *T. caninum* na célula. Da mesma forma, estudo realizado por Ley et al. (1988) demonstra que a forma amastigota é capaz de sustentar a infecção em células, visto que as amastigotas de *T. cruzi* originadas após diferenciação de formas tripomastigotas, foram inoculadas por 4 h com monócitos humanos *in vitro* e 90% ou mais de amastigotas de origem

extracelular foram absorvidas pelas células. Esse evento foi corroborado por Burleigh e Andrews (1995) e mais recentemente por Reignout et al. (2019). Fato esse que condiz com os resultados adquiridos nessa dissertação, no qual foi possível observar amastigotas extracelulares interagindo novamente com a célula, sugerindo um novo processo de infecção. Ou seja, é muito provável que *T. caninum* possa sustentar uma infecção por essa estratégia, da mesma maneira que *T. cruzi*.

Em *T. cruzi*, após duas horas de infecção, formas amastigotas escapam do vacúolo fagocítico, livres no citoplasma, se dividem e após 4-5 dias, se transformam em tripomastigotas (Levy et al. 1988). Com *T. caninum* foi observada, por MCC, a divisão de formas amastigotas dentro de vacúolos, e por MET foi observado que no mesmo vacúolo a presença de duas amastigotas, sugerindo o processo de divisão. No entanto, não foi observada mudança de forma evolutiva no citoplasma da célula e sim liberação da forma amastigota pela célula, mudança de forma das amastigotas para epimastigota aflagelar no meio extracelular e interação de amastigotas livres com a célula. O que leva a pensar que seja uma estratégia de evasão do parasito da célula para burlar o sistema imune da célula hospedeira.

Em estudo de interação entre *Trypanosoma copemani* e células PtK2 e Vero, foi observada a infecção, a interiorização de amastigotas, mas não observaram o aumento da quantidade de amastigotas. Adicionalmente, como essas formas amastigotas não foram observadas em processo de divisão, foram consideradas como amastigota-like. Os autores apontam para uma infecção, mas possivelmente sem ciclo intracelular. *Trypanosoma copemani* é conhecido por infectar marsupiais e está inserido no mesmo clado filogenético de *T. caninum* (Cooper et al. 2018). Diferente de *T. copemani*, aqui nesta dissertação, foi possível observar a divisão intracelular das formas amastigotas de *T. caninum*.

Apesar da utilização do Soro Fetal Bovino (SFB) ser uma questão bastante discutida, a comunidade científica ainda não chegou em um consenso de qual seria a melhor alternativa para sua substituição (Baker 2016; Van der Valk et al. 2018). Por esse motivo, foi decidido realizar também os experimentos com meio suplementado com Albumina Sérica Bovina (BSA). Nas duas condições na suplementação do meio de cultura (BSA e SFB), foram observados

os mesmos eventos principais: adesão, interiorização e interação de amastigotas. Em relação a quantidade de células em cada condição, foram observadas diferenças no experimento realizado com a linhagem celular DH82. O SFB contribuiu consideravelmente na multiplicação celular, pois na condição com BSA havia menos células dispostas pelas lamínulas, apesar da multiplicação das células. No tempo de 48 horas, no experimento com a linhagem celular DH82, foi observado que na condição com SFB havia uma confluência celular com células viáveis, já no cultivo em macrófagos peritoneais, principalmente na condição com meio suplementado com BSA, havia células rompidas, com bastante degradação, demonstrando uma interação intensa entre parasito e as células plaqueadas.

As diferenças estatísticas observadas nos eventos de adesão (p-valor 0.006241) e infecção (p-valor 0.0157) quando comparadas as condições de suplementação do meio de cultura (SFB e BSA) nas duas células macrofágicas, bem como a diferença observada entre os perfis dos gráficos das taxas de adesão entre os dois tipos celulares não interferiram na quantidade de parasitos dentro dos vacúolos parasitóforos, uma vez que não existiu diferença estatística (p-valor 0.309) neste evento quando comparado o uso de BSA e SFB. Isto demonstra o sucesso na infecção celular tanto utilizando BSA ou SFB.

O Test-T demonstrou que as melhores médias estão na interação em que foi utilizado a BSA na suplementação do meio de cultura para as duas células. Sendo assim, de acordo com os resultados apresentados, o uso do BSA pode ser uma alternativa em relação ao uso SFB, visto que durante os experimentos todos os eventos (adesão e infecção) foram observados e que não há diferenças estatísticas na quantidade de parasitos interiorizados. A BSA apresenta características nutricionais em sua composição que não promove grandes variações entre os lotes como na produção do SFB, fator importante na reprodutibilidade dos resultados (Zhou et al. 2020; Merlot et al. 2014). No entanto é necessário realizar experimentos com outros tipos celulares e parasitos e realizar novos testes estatísticos, a fim de confirmar se o uso da BSA realmente pode ser um substituto mais favorável do que o SFB nos experimentos de infecção experimental parasito-célula.

T. caninum é descrito como um parasito que parece não causar danos ao hospedeiro canino (Madeira et al. 2009; Barros et al. 2012). Os dados de

infecção experimental aqui apresentados nos leva a pensar que *T. caninum* infecta também as células do hospedeiro de forma rápida. Consequentemente, esse parasito não induziria resposta imunológica a ponto de produzir títulos de anticorpos altos nos hospedeiros, como descrito em estudos realizados sobre o diagnóstico sorológico utilizando amostras de soro de cães em que a cultura de pele foi positiva para *T. caninum* (Alves et al 2012; Madeira et al. 2014). Como demonstrado aqui, o fato de *T. caninum* entrar rápido na célula e mudar sua forma evolutiva, e consequentemente, mudar seus receptores de membrana pode ser o motivo da resposta imune baixa e ausência de infiltrado inflamatório detectável na histopatologia (Alves et al. 2012; Makino et al. 2020). Quando o parasito infecta rapidamente a célula e muda sua forma evolutiva para uma nova tentativa de infecção, é capaz de modular respostas distintas do hospedeiro, já que ocorre consequentemente a mudança de diversos antígenos de superfície, podendo assim usar estratégias diferentes para invadir as células hospedeiras (Ley et al.1988).

6 CONCLUSÕES

- *T. caninum* possui tempo de geração mais curto e alcança picos populacionais mais altos em meio axênico do que em cocultivo com a célula DH82;
- O uso do cocultivo de *T. caninum* com a linhagem celular DH82 confirmou ser uma importante estratégia na diferenciação das formas evolutivas tripomastigotas;
- As formas epimastigotas aflagelar e flagelar apresentam ultraestruturas comuns a espécies do gênero *Trypanosoma*, com destaque a intensa quantidade de corpúsculos lipídicos;
- Pela primeira vez, é demonstrada a infecção intracelular de *T. caninum*;
- A forma epimastigota aflagelar de *T. caninum* é infectiva para células macrofágicas em condições experimentais;
- *T. caninum* apresenta todas as formas evolutivas do gênero *Trypanosoma*, incluindo a forma amastigota que até então era desconhecida;
- A interação entre *T. caninum* e as células macrofágicas apresenta como características próprias a extrema rapidez (15 minutos) e falta de padrão na adesão do parasito, que pode ser realizada por projeções da célula ou de forma ativa pelo parasito;
- Ao sair da célula, a forma amastigota se diferencia em epimastigota aflagelar no meio extracelular ou interage novamente com a célula numa tentativa de reinfecção;
- O fato de que *T. caninum* é capaz de infectar células e o conhecimento da sua forma amastigota são informações inéditas que serão úteis em estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*, estudos de infecção natural e entendimentos sobre os métodos diagnósticos deste parasito.

7 REFERÊNCIAS

Acosta, I.C.L.; Da Costa, A.P.; Nunes, P.H.; *et al.* Morphological and molecular characterization and phylogenetic relationships of a new species of trypanosome in *Tapirus terrestris* (lowland tapir), *Trypanosoma terrestris* sp. nov., from Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. *Parasites and Vectors*. 2013; v. 6, n. 1, p. 1–12.

Alves, A.S.; Mouta-Confort, E.; Figueiredo, F.B.; *et al.* Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. *Research in veterinary science*. 2012; v. 93, n. 3, p. 1329-1333.

Alves, E.A.; Guimarães, A.C.R. Cultivo celular. In: Molinaro, Etelcia Moraes; Caputo, Luzia Fátima Gonçalves; Amendoeira, Maria Regina Reis (Org.). *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*. v.2. Rio de Janeiro: EPSJV. 2010; p. 215-253.

Andrade-Filho, J.S. Letter to the editor analogies in Medicine: GimLet in Chagas Disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2013; 55(1):68.

Austen, J. M.; Jefferies, R.; Friend, J. A.; *et al.* Morphological and molecular characterization of *Trypanosoma copemani* n. sp. (Trypanosomatidae) isolated from *Gilbert's potoroo* (*Potorous gilbertii*) and *quokka* (*Setonix brachyurus*). *Parasitology*. 2009; v. 136, n. 7, p. 783–792.

Austen, J. M.; Ryan, U. M.; Friend, J. A.; *et al.* Vector of *Trypanosoma copemani* identified as *Ixodes* sp. *Parasitology*. 2011; v. 138, n. 7, p. 866–872.

Baker, M. Reproducibility: Respect your cells! *Nature*. 2016; v. 537, n. 7620, p. 433–435.

Barrias, E.S.; Reignault, L.C.; De Souza, W.; *et al.* *Trypanosoma cruzi* uses macropinocytosis as an additional entry pathway into mammalian host cell. *Microbes and Infection*. 2012; v. 14, n. 14, p. 1340–1351.

Barrias, E.; Reignault, L.; de Carvalho, T. M.; *et al.* Clathrin coated pit dependent pathway for *Trypanosoma cruzi* internalization into host cells. *Acta tropica*. 2019; v. 199, p. 105057.

Barros, J.H.S.; Almeida, A.B.P.F.; Figueiredo, F.B.; *et al.* Occurrence of

Trypanosoma caninum in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: What is the real impact of canine leishmaniasis control? Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2012; v. 106, n. 7, p. 419–423.

Barros, J.H.S. *Trypanosoma caninum*, estudo com isolados de diferentes regiões brasileiras. Tese (Doutorado). Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas; 2013. 86 pp.

Barros, J.H.S.; Fonseca, T.S.; Macedo-Silva, R.M.; *et al.* Aflagellar epimastigote forms are found in axenic culture of *Trypanosoma caninum*. Acta Tropica. 2014; v. 137, p. 147–151.

Barros, J.H.S.; Toma, H.K.; Madeira, M.F. Molecular study of *Trypanosoma caninum* isolates based on different genetic markers. Parasitology Research. 2015; v. 114, n. 2, p. 777–783.

Barros, J.H.S.; Lima, L.; Schubach, A.O.; Teixeira, M.M.G. *Trypanosoma madeirae* sp. n.: A species of the clade *T. cruzi* associated with the neotropical common vampire bat *Desmodus rotundus*. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. 2019; v. 8, p. 71–81.

Bastin, P.; Gull, K. Assembly and function of complex flagellar structures illustrated by the paraflagellar rod of trypanosomes. Protist. 1999; v. 150, n. 2, p. 113–123.

Bello F.J; Mejía A.J.; Corena M.P.; Ayala M.; Sarmiento, L.; Zuñiga, C.; *et al.* Experimental infection of *Leishmania (L) chagasi* in a cell line derived from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; v. 100, n. 6, p. 519-25.

Bozza, P.T.; Bakker-Abreu, I.; Navarro-Xavier, R. A.; & Bandeira-Melo, C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids (PLEFA). 2011; v. 85, n. 5, p. 205-213.

Buchanan, R.E. "Life phases in a bacterial culture." *The Journal of Infectious Diseases* .1918; p. 109-125.

Burleigh, B.A., & Andrews, N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. Annual review of microbiology. 1995; v. 49, n.1, p. 175-200.

Chagas,C. Nova tripanozomiose humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1909; v.1.

p. 159–218.

Chagas.fiocruz.br/interação [homepage on the Internet]. Portal da Doença de Chagas-© 2017 (cited 2020 April 10). Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/interacao/>

Calabrese, K.S.; Silva, L.S; Carvalho, L.O.P.; *et al.* Infection of retinal epithelial cells with *L. amazonensis* impacts in extracellular matrix proteins. *Parasitology Research*. 2011; v. 109, n. 3, p. 727–736.

Cassado, A.A. Heterogeneidade dos macrófagos peritoneais. Tese (Doutorado). Instituto Biomédico da Universidade de São Paulo; 2011.136 pp.

Cooper, C; Andrew T, R. C.; Rigby, P.; *et al.* The marsupial trypanosome *Trypanosoma copemani* is not an obligate intracellular parasite, although it adversely affects cell health. *Parasites and Vectors*. 2018; v. 11, n. 1, p. 1–14.

Da Rocha, R.F.D.B.; Larocque-De-Freitas, I.F.; Arcanjo, A.F.; *et al.* B-1 cells may drive macrophages susceptibility to trypanosoma cruzi infection. *Frontiers in Microbiology*. 2019; v. 10, n. JULY, p. 1–10.

D'Avila, H.; Freire-De-Lima, C.G.; Roque, N.R.; Teixeira, L.; Barja-Fidalgo, C.; Silva, A.R., ... & Bozza, P.T. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E2 generation and increased parasite growth. *Journal of Infectious Diseases*. 2011; v. 204, n. 6, p. 951-961.

D'Avila-Levy, C.M.; Boucinha, C.; Kostygov, A.; *et al.* Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015; v. 110, n. 8, p. 956–965.

De La Cruz, V.; Neckelmann N.; Simpson, L. Sequences of six genes and several open reading frames in the kinetoplast maxcircle DNA of *Leishmania tarantole*. *Jornal of Biological Chemistry* .1984; v. 259: n. 24, p. 15136-15147.

De Souza, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current pharmaceutical design*. 2002; v. 8, n. 4, p. 269-285.

De Souza, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009; v. 104, n. SUPPL. 1, p. 89–100.

De Souza, W.; De Carvalho,T.M.U.; Barrias, E.S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. *International Journal of Cell Biology*. 2010; v. 2010.

De Souza, W.; Carvalho, U.T.M. Active penetration of *Trypanosoma cruzi* into host cells: Historical considerations and current concepts. *Frontiers in Immunology*. 2013; v. 4, n. JAN, p. 2–4.

Docampo, R., De Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., & Moreno, S. N. Acidocalcisomes? Conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*. 2005; v. 3, n. 3, p. 251-261.

Dos Anjos Cassado, A. F4/80 as a major macrophage marker: the case of the peritoneum and spleen. In *Macrophages*. Springer, Cham. 2017; p. 161-179.

Dos Santos, C.M.B.; Ludwig, A.; Kessler, R.L.; *et al.* *Trypanosoma cruzi* transcriptome during axenic epimastigote growth curve. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2018; v. 113, n. 5, p. 1–13.

Duque, T.L.A.; Siqueira, M.S.; Travassos, L.H.; *et al.* The induction of host cell autophagy triggers defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection *in vitro*. *European Journal of Cell Biology*. 2020; v. 99, n. 1, p. 151060.

Dyachenko, V.; Steinmann, M.; Bangoura, B.; *et al.* Co-infection of *Trypanosoma pestanaei* and *Anaplasma phagocytophilum* in a dog from Germany. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 2017; v. 9, n. May, p. 110–114.

Fessel, M.R. Interação *Trypanosoma cruzi*-célula hospedeira: estudo do “domínio FLY”, motivo carboxi-subterminal conservado na superfamília das gp85/trans-sialidases. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, departamento de Bioquímica - Universidade de São Paulo; 2006. 100 pp.

Fonseca-Oliveira, T.S.; Barros, J.H.S.; Madeira, J.B.; *et al.* Biological study of *Trypanosoma caninum* under co-culture with different feeder layer cells. *Acta Tropica*. 2018; v. 187, n. June, p. 44–50.

Galvão, C.; Carcavallo, R.; Rocha, D.S; *et al.* A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*. 2003; v. 202, n. 1, p. 1.

Gaush, C. R.; Smith, T. F. Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells. *Applied microbiology*. 1968; v. 16, n. 4, p. 588–594.

Gonçalves, C.S.; Ávila, A.R.; De Souza, W.; *et al.* Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: Morphological and ultrastructural

analyses during cell differentiation. *Parasites and Vectors*. 2018; v. 11, n. 1, p. 1–14.

Hamilton, P. B.; Stevens, J. R. Classification and phylogeny of *Trypanosoma cruzi*. Second Edition. [s.l.]: Elsevier Inc. 2017; p. 321-344.

Hamilton, P.B.; Gibson, W.C.; Stevens, J.R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2007; v. 44, n. 1, p. 15–25.

Hamilton, P.B.; Stevens, J.R.; Gaunt, M.W.; *et al.* Trypanosomes are monophyletic: Evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *International Journal for Parasitology*. 2004; v. 34, n. 12, p. 1393–1404.

Herrmann, I.; Gotovina, J.; Fazekas-Singer, J.; Fischer, M.B.; Hufnagl, K.; Bianchini, R.; & Jensen-Jarolim, E. Canine macrophages can like human macrophages be *in vitro* activated toward the M2a subtype relevant in allergy. *Developmental & Comparative Immunology*. 2018; v. 82, p. 118-127.

Hoare, C.A. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Blackwell, Oxford, England, 1972 (U.S. distributor, Davis, Philadelphia). 1972; xviii, 750 pp.

Hoare, C., Wallace, F. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature*. 1966; v. 212, p. 1385–1386.

Kaufer, A.; Ellis, J.; Stark, D.; *et al.* The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors*. 2017; v. 10, n. 1, p. 287.

Kessler, R.L.; Contreras, V.T.; Marlière, N.P.; *et al.* Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. *Molecular Microbiology*. 2017; v. 104, n. 5, p. 712–736.

Lee, Y.F.; Cheng, C.C.; Lin, N.N.; *et al.* Isolation of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* from dairy cattle in Taiwan. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2010; v. 72, n. 4, p. 417–424.

Ley, V.; Andrews, N.W.; Robbins, E.S.; *et al.* Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *The Journal of experimental medicine*. 1988; v.168, n. 2, p. 649-659.

Li, F.-J., & He, C.Y. Autophagy in protozoan parasites: *Trypanosoma brucei* as a model. *Future Microbiology*. 2017; v. 12, n. 15, p.1337–1340

Lima, L.; Espinosa-Álvarez, O.; Pinto, C.M.; *et al.* New insights into the evolution of the *Trypanosoma cruzi* clade provided by a new trypanosome species tightly linked to Neotropical Pteronotus bats and related to an Australian lineage of trypanosomes. *Parasites and Vectors*. 2015; v. 8, n. 1, p. 1–18.

Liston, A.J.; Baker, J.R. Entry of *Trypanosoma (Schizotrypanum) dionisii* to macrophages *in vitro* and its subsequent fate therein. *Microbiology*. 1978; v. 107, n. 2, p. 253-262.

Lizundia, R.; Newman, C.; Buesching, C.D.; *et al.* Evidence for a role of the host-specific flea (*Paraceras melis*) in the transmission of *Trypanosoma (Megatrypanum) pestanai* to the European badger. *PLoS ONE*. 2011; v. 6, n. 2.

Lopes, C.M.T. Nova espécie de *Trypanosoma* isolada de *Didelphis aurita* na Mata Atlântica do Rio de Janeiro: caracterização biológica e molecular. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária; 2016. 85 pp.

Lopes, C.M.T; Menna-Barreto, R.F.S; Pavan, M.G.; *et al.* *Trypanosoma janseni* n. Sp. (trypanosomatida: Trypanosomatidae) isolated from *didelphis aurita* (mammalia: Didelphidae) in the atlantic rainforest of rio de janeiro, brazil: Integrative taxonomy and phylogeography within the *trypanosoma cruzi* clade. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2018; v. 113, n. 1, p. 45–55.

Madeira, M.F.; Sousa, M.A.; Barros, J.H.S.; *et al.* *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology*. 2009; v. 136, n. 4, p. 411–423.

Madeira, M.F., Almeida, A.B., Barros, J.H.; *et al.* *Trypanosoma caninum*, a new parasite described in dogs in Brazil: aspects of natural infection. *Journal of Parasitology*. 2014; v. 100, n. 2, p. 231-234.

Makino, H.; Moreira, J.M.A.R.; Bezerra, K.S.; *et al.* Clinical-dermatological, histological abnormalities and prevalence of *Trypanosoma caninum* and *Leishmania infantum* in dogs from midwest region of Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. 2020; v. 29, n. 1, p. 1–9.

Martins, C.B. Identificação molecular de Tripanossomatídeos da coleção de protozoários da Fiocruz (Fiocruz-Colprot) / Carolina Boucinha Martins. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular; 2016. 178 pp.

McInnes, L.M.; Hanger, J.; Simmons, G.; *et al.* Novel trypanosome *Trypanosoma gilletti* sp. (euglenozoa: Trypanosomatidae) and the extension of the host range of *Trypanosoma copemani* to include the koala (*Phascolarctos cinereus*). *Parasitology*. 2011; v. 138, n. 1, p. 59–70.

Michaels, D.L.; Leibowitz, J.A.; Azaiza, M.T.; SHIL, P.K.; Shama, S.M.; Kutish, G.F.; ... & Brown, D.R. Cellular microbiology of *Mycoplasma canis*. *Infection and immunity*. 2016; v. 84, n. 6, p. 1785-1795.

Melo, R.C.; D'Avila, H.; Wan, H.C.; Bozza, P.T.; Dvorak, A.M; e Weller, P.F. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2011; v. 59, n. 5, p. 540-556.

Mellor, D.J.; Diesch, T.J.; Gunn, A.J.; *et al.* The importance of “awareness” for understanding fetal pain. *Brain Research Reviews*. 2005; v. 49, n. 3, p. 455–471.

Mendonça, P.H.B.; Da Rocha, R.F.D.B.; Moraes, J.B.B.; *et al.* Canine macrophage DH82 cell line as a model to study susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Frontiers in Immunology*. 2017; v. 8, n. MAY.

Merlot, A.M.; Kalinowski, D.S.; Richardson, R. Unraveling the mysteries of serum albumin-more than just a serum protein. *Frontiers in Physiology*. 2014; v. 5 Aug, n. August, p. 1–7.

Michaels, D.L.; Leibowitz, J.A.; Azaiza, M.T.; *et al.* Cellular microbiology of *Mycoplasma canis*. *Infection and immunity*. 2016; v. 84, n. 6, p.1785-1795.

Miranda, K.; Benchimol, M.; Docampo, R.; De Souza, W. The fine structure of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 2000; v. 86, p. 373–384.

Miranda, K., Docampo, R., Grillo, O., & De Souza, W. Acidocalcisomes of trypanosomatids have species-specific elemental composition. *Protist*. 2004; v. 155, n.4, p. 395-405.

Molina, J.P. Universidade estadual de campinas instituto de biologia; 2016. 100 pp.

Moore, K.; Persaud T.V.N; Torchia M.G.; *Embriologia básica / Keith L. Moore, [tradução Danuza Pinheiro Bastos, Renata Scavone de Oliveira]. - 9. ed. - Rio de Janeiro: Elsevier; 2016. 463 pp.*

Oliveira, T.S.F.; Barros, J.H.S.; Perez, T.D.; *et al.* Report of new cases of

Trypanosoma caninum in Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2015; v. 48, n. 3, p. 347–349.

Oliveira, T.S.F. *Trypanosoma caninum*: monitoramento de eventos morfológicos durante o processo de infecção natural e experimental. Tese (Doutorado)-Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz; 2016. pp 73.

Peacock, L.; Kay, C.; Bailey, M.; *et al.* Shape-shifting trypanosomes: Flagellar shortening followed by asymmetric division in *Trypanosoma congolense* from the tsetse proventriculus. PLoS Pathogens. 2018; v. 14, n. 5, p. 1–22.

Peirce, M.A. British Note Pestanai Meles) in (Megatrypanum) Badgers. 2000; p. 439–440.

Pinto, A.G.S.; Schubach, T.M.P.; Figueiredo, F.B.; *et al.* Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. Parasitology. 2010; v. 137, n. 11, p. 1653-1660.

Podinovskaia, M.; Descoteaux, A. *Leishmania* and the macrophage: A multifaceted interaction. Future Microbiology. 2015; v. 10, n. 1, p. 111–129.

Porfirio, G.E.O.; Santos, F.M.; De Macedo, G.C.; *et al.* Maintenance of *Trypanosoma cruzi*, *T. evansi* and *Leishmania* spp. by domestic dogs and wild mammals in a rural settlement in Brazil-Bolivian border. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. 2018; v. 7, n. 3, p. 398–404.

Puck, T.T.; Cieciura, S.J.; Robinson, A. Genetics of somatic mammalian cells: III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. Journal of Experimental Medicine. 1958; v. 108, n. 6, p. 945-956.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/> version 3.6.0(2019-04-26).

Ravi, M.; Paramesh, V.; Kaviya, S. R.; *et al.* 3D cell culture systems: Advantages and applications. Journal of Cellular Physiology. 2015; v. 230, n. 1, p. 16–26.

Reignault, L.C.; Alcantara, C.L.; Barrias, E.S.; *et al.* 3D reconstruction of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction shows the recruitment of host cell organelles towards parasitophorous vacuoles during its biogenesis. Journal of Structural Biology. 2019; v. 205, n. 2, p. 133–146.

Rittig, M.G.; Schröppel, K.; Seack, K.H.; *et al.* Coiling phagocytosis of

trypanosomatids and fungal cells. *Infection and Immunity*. 1988; v. 66, n. 9, p. 4331–4339.

Rodrigues, M.S. Diversidade , especificidade e distribuição geográfica de *Trypanosoma spp* . em mamíferos. Tese (doutorado) Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação Biologia Parasitária; 2019. 104 pp.

Russo, M.; Starobinas, N.; Ribeiro-Dos-Santos, R.; *et al.* Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology*. 1989; v. 11, n. 4, p. 385–395.

Scherer, W.F; Syverton, J.T. e Gey, G.O. Estudos sobre a propagação *in vitro* de vírus da poliomielite: IV. Multiplicação viral em uma cepa estável de células epiteliais malignas humanas (cepa HeLa) derivada de um carcinoma epidermóide do colo do útero. *The Journal of experimental medicine*. 1953; v. 97 n.5, p. 695-710.

Stevens, D.R.; Moulton, J.E. Ultrastructural and immunological aspects of the phagocytosis of *Trypanosoma brucei* by mouse peritoneal macrophages. *Infection and Immunity*. 1978; v. 19, n. 3, p. 972–982.

Stevens, J.R; Noyes, H.A; Schofield, C.J; *et al.* The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Advances in parasitology*. 2001; v. 48, p. 1–56.

Stuart, K.; Brun, R.; Croft, S.; Fairlamb. A.; Gurtler, R.E.; mckerrow, J.; reed, S.; tarleton, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest*. 2008; v.118, p. 1301-1310.

Szabo, E.K.; Finney, C.A.M. *Toxoplasma gondii*: one organism, multiple models. *Trends in parasitology*. 2017; v. 33, n. 2, p. 113-127.

Thekiso, O. M.M.; Honda, T.; Fujita, H.; *et al.* A trypanosome species isolated from naturally infected *Haemaphysalis hystricis* ticks in Kagoshima Prefecture, Japan. *Parasitology*. 2007; v. 134, n. 7, p. 967–974.

Thomaz, N.; Deane, M.P. *Trypanosoma (Megatuypanum) freitasi*. 1990; v. 37, n. 1, p. 40–43.

Toledo, D.A.M. Corpúsculos Lipídicos em *Trypanosoma Cruzi* : Análise e Correlação com a Fisiopatologia da doença de Chagas. Dissertação (Mestrado) Instituto Oswaldo Cruz, Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular; 2013. 73 pp.

Toledo, D.A.; D'Avila, H.; & Melo, R.C.. Host lipid bodies as platforms for

intracellular survival of protozoan parasites. *Frontiers in immunology*. 2016; v. 7, p.174.

Toledo, D. A.; Roque, N. R.; Teixeira, L.; *et al.* Lipid body organelles within the parasite *Trypanosoma cruzi*: a role for intracellular arachidonic acid metabolism. *PLoS One*. 2016; v.11, n. 8.

Tyler, K.M.; Engman, D.M. Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 2000; v. 46, n. 4, p. 269–278.

Thurston, JP. The effect of immune sera on the respiration of *Trypanosoma brucei in vitro*. *Parasitology*. 1958; 48 (3-4), 463.

Uezato, H.; Kato, H.; Kayo, S.; *et al.* The attachment and entry of *Leishmania (Leishmania) major* into macrophages: Observation by scanning electron microscope. *Journal of Dermatology*. 2005; v. 32, n. 7, p. 534–540.

Unkeless, J.C. Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *The Journal of Experimental Medicine*. 1979; v. 150, n. 3, p. 580–596.

Van Der Valk, J.; Bieback, K.; Buta, C.; *et al.* Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *Altex*. 2018; v. 35, n. 1, p. 99–118.

Vickerman, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *International journal for parasitology*. 1994; v. 24, n. 8, p. 1317–31.

Vincendeau, P.; Caristan, A.; Pautrizel, R. Macrophage function during *Trypanosoma musculi* infection in mice. *Infection and Immunity*. 1981; v. 34, n. 2, p. 378–381.

Viola, L.B.; Attias, M.; Takata, C.S.A.; *et al.* Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2009; v. 56, n. 6, p. 594–602.

Wellman, M.L.; Krakowka, S.; Jacobs, R.M.; *et al.* A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 1988; v. 24, n. 3, p. 223–229.

Zhou, J.; Gao, H.; XIE, W.; *et al.* Bovine serum albumin affects N-glycoforms of murine IgG monoclonal antibody purified from hybridoma

supernatants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020; v. 104, n. 4, p. 1583–1594.

Zheng, X.; Zhu, Y.; Zhao, Z.; *et al.* RNA sequencing analyses of gene expressions in a canine macrophages cell line DH82 infected with canine distemper virus. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020; v. 80, p.104206.

8 ANEXOS

Análise estatística

Modelo Anova Infecção

```
aov(formula = Nrinfec ~ Tipo_cel + Tipo_sup + Tempo + Lam, data = dat)
```

Terms:

	Tipo_cel	Tipo_sup	Tempo	Lam	Residuals
Sum of Squares	146667.86	7657.19	110376.95	97663.17	88760.79
Deg. of Freedom	1	1	6	2	73

Residual standard error: 34.86977

Estimated effects may be unbalanced

```
> summary(mod1)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tipo_cel	1	146668	146668	120.625	< 2e-16 ***
Tipo_sup	1	7657	7657	6.298	0.0143 *
Tempo	6	110377	18396	15.130	3.59e-11 ***
Lam	2	97663	48832	40.161	1.72e-12 ***
Residuals	73	88761	1216		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> shapiro.test(mod1$residuals) # Não rejeitou
```

Shapiro-Wilk normality test

data: mod1\$residuals

W = 0.98002, p-value = 0.2171

Pressupostos:

#Homogeneity of variance

```
> leveneTest(res ~ Tipo_cel, data = dat) # não rejeitou
```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

	Df	F value	Pr(>F)
group 1	1	0.452	0.5033
	82		

```
> leveneTest(res ~ Tipo_sup, data = dat) # não rejeitou
```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

	Df	F value	Pr(>F)
group 1	1	1.3411	0.2502
	82		

```
> leveneTest(res ~ Tempo, data = dat) # não rejeitou
```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

```
Df F value Pr(>F)
group 6 0.4415 0.8488
77
```

```
> leveneTest(res ~ Lam, data = dat)#rejeitou
```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

```
Df F value Pr(>F)
group 2 8.7947 0.0003496 ***
81
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> ### qto mais perto de 2 o valor DW rejeita-se H0:p = 0
```

```
> ### DW < dl - autocorrelação positiva e DW > (4 - dl) - autocorrelação negativa
```

```
> ### dl é tabelado
```

```
> durbinWatsonTest(mod1) # rejeitou
```

```
lag Autocorrelation D-W Statistic p-value
1 0.3093759 1.367781 0
```

Alternative hypothesis: rho != 0

```
> dwtest(mod1) # rejeitou
```

Durbin-Watson test

data: mod1

DW = 1.3678, p-value = 0.0007382

alternative hypothesis: true autocorrelation is greater than 0

##Retirando a lâmina 3

```
mod1_new <- aov(Nrinfec ~ Tipo_cel + Tipo_sup + Tempo + Lam, data = newdat)
```

```
> summary(mod1_new)
```

```
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tipo_cel  1 55000  55000 120.497 1.93e-14 ***
Tipo_sup  1  2871   2871   6.291 0.0157 *
Tempo     6 41391   6899 15.114 1.82e-09 ***
Lam       1   270    270   0.592 0.4456
Residuals 46 20997    456
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Como o fator Lam não foi significativo foi retirado

```
mod1_new <- aov(Nrinfec ~ Tipo_cel + Tipo_sup + Tempo, data = newdat)
```

```
> summary(mod1_new)
```

```
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tipo_cel  1 55000  55000 121.552 1.25e-14 ***
Tipo_sup  1  2871   2871   6.346  0.0152 *
Tempo     6 41391   6899  15.246 1.33e-09 ***
Residuals 47 21267   452
```

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Pressupostos:

```
## Normality
```

```
shapiro.test(mod1_new$residuals) # não rejeitou
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: mod1_new$residuals
```

```
W = 0.98291, p-value = 0.6091
```

```
#Homogeneity of variance
```

```
leveneTest(mod1_new$residuals ~ Tipo_cel, data = newdat)#Não rejeitou
```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

```
      Df F value Pr(>F)
group  1  0.9707 0.3289
      54
```

```
> leveneTest(mod1_new$residuals ~ Tipo_sup, data = newdat) #Não rejeitou
```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

```
      Df F value Pr(>F)
group  1  3.7467 0.05815 .
      54
```

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
> leveneTest(mod1_new$residuals ~ Tempo, data = newdat)#Não rejeitou
```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

```
      Df F value Pr(>F)
group  6  0.8224 0.5581
      49
```

```
### qto mais perto de 2 o valor DW, rejeita-se H0:p = 0 (Independência)
```

```
### DW < dl - autocorrelação positiva e DW > (4 - dl) - autocorrelação negativa
```

```
### dl é tabelado
durbinWatsonTest(mod1_new) # não rejeitou
dwtest(mod1_new) # não rejeitou
```

```
lag Autocorrelation D-W Statistic p-value
  1  0.06589154  1.851559  0.524
Alternative hypothesis: rho != 0
> dwtest(mod1_new) # não rejeitou
```

Durbin-Watson test

```
data: mod1_new
DW = 1.8516, p-value = 0.25
alternative hypothesis: true autocorrelation is greater than 0
```

Conclusão - Modelo 1 aprovado

Modelo 2 – Nr de parasitas

###Modelo 2 - Nr parasitas

```
mod2 <- aov(Nrpara ~ Tipo_cel + Tipo_sup + Tempo + Lam, data = newdat)
summary(mod2)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tipo_cel  1 1191069 1191069  90.385 1.98e-12 ***
Tipo_sup  1  13923  13923  1.057  0.309
Tempo     6  703483 117247  8.897 1.88e-06 ***
Lam       1    780    780  0.059  0.809
Residuals 46 606174 13178
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

retirando o Ftaor Lam, como no mod1

```
mod2 <- aov(Nrpara ~ Tipo_cel + Tipo_sup + Tempo, data = newdat)

summary(mod2)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tipo_cel  1 1191069 1191069  92.231 1.16e-12 ***
Tipo_sup  1  13923  13923  1.078  0.304
Tempo     6  703483 117247  9.079 1.35e-06 ***
Residuals 47 606954 12914
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
## Tipo_sup tb não foi significativo
```

```
mod2 <- aov(Nrpara ~ Tipo_cel + Tempo, data = newdat)
```

```
summary(mod2)
```

```
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tipo_cel  1 1191069 1191069  92.082 9.60e-13 ***
Tempo     6  703483  117247   9.064 1.25e-06 ***
Residuals 48  620877  12935
```

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
## Pressupostos
```

```
## Normality
```

```
shapiro.test(mod2$residuals) #passou
```

```
Shapiro-Wilk normality test
```

```
data: mod2$residuals
```

```
W = 0.97857, p-value = 0.417
```

```
#Homogeneity of variance
```

```
leveneTest(mod2$residuals ~ Tipo_cel, data = newdat) # não rejeitou
```

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
```

```
      Df F value Pr(>F)
group 1  1.3607 0.2485
      54
```

```
> leveneTest(mod2$residuals ~ Tempo, data = newdat) # não rejeitou
```

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
```

```
      Df F value Pr(>F)
group 6  1.7341 0.1329
      49
```

```
#Autocorrelation
```

```
#### qto mais perto de 2 o valor DW rejeita-se H0:p = 0 9Independência)
```

```
#### DW < dl - autocorrelação positiva e DW > (4 - dl) - autocorrelação negativa
```

```
#### dl é tabelado
```

```
durbinWatsonTest(mod2) # Não rejeitou
```

```
dwtest(mod1Trans) # Não rejeitou
```

```
lag Autocorrelation D-W Statistic p-value
  1  0.06074757  1.853539 0.612
Alternative hypothesis: rho != 0
> dwtest(mod2) # Não rejeitou
```

Durbin-Watson test

```
data: mod2
DW = 1.8535, p-value = 0.2978
alternative hypothesis: true autocorrelation is greater than 0
```

```
###Criando o modelo de AOV com as variáveis originais (Adesão)
mod1 <- aov(Nrpara ~ Tipo_cel + Tipo_sup + Tempo + Lam, data = dat)
```

```
summary(mod1)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tipo_cel  1  283    283  0.464 0.498993
Tipo_sup  1 5016   5016  8.217 0.006241 **
Tempo     6 17929   2988  4.895 0.000607 ***
Lam       1  311    311  0.510 0.478885
Residuals 46 28082    610
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
###Assumptions
## Normality
shapiro.test(mod1$residuals) # Não rejeitou
Shapiro-Wilk normality test
```

```
data: mod1$residuals
W = 0.97869, p-value = 0.4218
```

```
#Homogeneity of variance
leveneTest(res ~ Tipo_cel, data = dat)# não rejeitou
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
      Df F value Pr(>F)
group  1  0.2359 0.6292
      54
> leveneTest(res ~ Tipo_sup, data = dat) # não rejeitou
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
      Df F value Pr(>F)
group  1  3.2322 0.0778 .
      54
```

```

---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> leveneTest(res ~ Tempo, data = dat) # não rejeitou
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 6  1.0884 0.3825
  49
leveneTest(res ~ Lam, data = dat)#rejeitou

```

```

durbinWatsonTest(mod1) # não rejeitou
dwttest(mod1) # não rejeitou
lag Autocorrelation D-W Statistic p-value
  1 -0.00255615  1.879795 0.556
Alternative hypothesis: rho != 0
> dwttest(mod1) # rejeitou

```

Durbin-Watson test

```

data: mod1
DW = 1.8798, p-value = 0.2435
alternative hypothesis: true autocorrelation is greater than 0

```

Como o fator Lam e Tipo_cel não foram significativos foram retirados

```

summary(mod1)
  Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tipo_sup  1  5016  5016  8.396 0.005650 **
Tempo    6 17929  2988  5.002 0.000474 ***
Residuals 48 28676   597

```

```

---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

###Assumptions

Normality

```
shapiro.test(mod1$residuals) # Não rejeitou
```

Shapiro-Wilk normality test

```

data: mod1$residuals
W = 0.9814, p-value = 0.5376

```

#Homogeneity of variance

```

leveneTest(res ~ Tipo_sup, data = dat) # não rejeitou
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

```

```
Df F value Pr(>F)
group 1 2.8871 0.09504 .
54
```

```
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
> leveneTest(res ~ Tempo, data = dat) # não rejeitou
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
```

```
Df F value Pr(>F)
group 6 0.9235 0.4864
49
```

```
### qto mais perto de 2 o valor DW rejeita-se H0:p = 0
```

```
### DW < dl - autocorrelação positiva e DW > (4 - dl) - autocorrelação negativa
```

```
### dl é tabelado
```

```
durbinWatsonTest(mod1) # não rejeitou
```

```
dwtest(mod1) # não rejeitou
```

```
lag Autocorrelation D-W Statistic p-value
```

```
1 0.03393527 1.808799 0.514
```

```
Alternative hypothesis: rho != 0
```

```
> dwtest(mod1) # rejeitou
```

Durbin-Watson test

```
data: mod1
```

```
DW = 1.8088, p-value = 0.2487
```

```
alternative hypothesis: true autocorrelation is greater than 0
```

```
###Criando o modelo de AOV com as variáveis originais (Adesão + Infecção)
```

```
summary(mod1)
```

```
Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tipo_cel 1 2368 2368.0 14.182 0.000333 ***
Tipo_sup 1 1962 1962.3 11.752 0.001002 **
Tempo 6 3553 592.2 3.546 0.003888 **
Lam 2 2101 1050.6 6.292 0.003013 **
Residuals 73 12189 167.0
```

```
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
#Homogeneity of variance
```

```
> leveneTest(res ~ Tipo_cel, data = dat)# não rejeitou
```

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
```

```
Df F value Pr(>F)
```

```
group 1 3.1664 0.07887 .
      82
```

```
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
> leveneTest(res ~ Tipo_sup, data = dat) # rejeitou
```

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
```

```
  Df F value Pr(>F)
```

```
group 1 4.8754 0.03003 *
```

```
      82
```

```
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
> leveneTest(res ~ Tempo, data = dat) # não rejeitou
```

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
```

```
  Df F value Pr(>F)
```

```
group 6 1.6779 0.1377
```

```
      77
```

```
> leveneTest(res ~ Lam, data = dat)# não rejeitou
```

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
```

```
  Df F value Pr(>F)
```

```
group 2 2.8364 0.06447 .
```

```
      81
```

```
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
lag Autocorrelation D-W Statistic p-value
```

```
 1 -0.1228117 2.232596 0.46
```

```
Alternative hypothesis: rho != 0
```

```
> dwtest(mod1) # não rejeitou
```

Durbin-Watson test

```
data: mod1
```

```
DW = 2.2326, p-value = 0.762
```

```
alternative hypothesis: true autocorrelation is greater than 0
```

```
###Retirando a lâmina 3
```

```
aov(formula = Nrinfec ~ Tipo_cel + Tipo_sup + Tempo + Lam, data = newdat)
```

```
summary(mod1_new)
```

```
  Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
```

```
Tipo_cel  1  888  888.0  8.916 0.00452 **
```

```
Tipo_sup  1  736  735.9  7.388 0.00923 **
```

```
Tempo    6 1332  222.1  2.230 0.05693 .
```

```
Lam      1  50  50.2  0.504 0.48149
Residuals 46 4582  99.6
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Como o fator Lam não foi significativo foi retirado

```
mod1_new <- aov(Nrinfec ~ Tipo_cel + Tipo_sup + Tempo, data = newdat)
```

```
summary(mod1_new)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tipo_cel  1  888  888.0  9.011 0.00429 **
Tipo_sup  1  736  735.9  7.467 0.00883 **
Tempo     6 1332  222.1  2.253 0.05419 .
Residuals 47 4632  98.5
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Normality

```
> shapiro.test(mod1_new$residuals) # rejeitou
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: mod1_new$residuals
W = 0.9416, p-value = 0.009095
```

#Homogeneity of variance

#Homogeneity of variance

```
> leveneTest(mod1_new$residuals ~ Tipo_cel, data = newdat)#Não rejeitou
```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

```
      Df F value Pr(>F)
group 1  3.1162 0.08317 .
      54
```

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
> leveneTest(mod1_new$residuals ~ Tipo_sup, data = newdat) # rejeitou
```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

```
      Df F value Pr(>F)
group 1  8.2883 0.005708 **
      54
```

```
---
```

```

Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> leveneTest(mod1_new$residuals ~ Tempo, data = newdat)#Não rejeitou
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 6  0.9717 0.4543
  49
durbinWatsonTest(mod1_new) # não rejeitou
lag Autocorrelation D-W Statistic p-value
  1  -0.1240749  2.224066  0.528
Alternative hypothesis: rho != 0
> dwtest(mod1_new) # não rejeitou

```

Durbin-Watson test

```

data: mod1_new
DW = 2.2241, p-value = 0.7402
alternative hypothesis: true autocorrelation is greater than 0

```

Modelo sem o Tempo

```

mod1_new <- aov(Nrinfec ~ Tipo_cel + Tipo_sup, data = newdat)
> mod1_new
Call:
aov(formula = Nrinfec ~ Tipo_cel + Tipo_sup, data = newdat)

```

Terms:

	Tipo_cel	Tipo_sup	Residuals
Sum of Squares	888.018	735.875	5964.089
Deg. of Freedom	1	1	53

Residual standard error: 10.60802

Estimated effects may be unbalanced

```

> summary(mod1_new)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tipo_cel  1   888   888.0  7.891 0.00694 **
Tipo_sup  1   736   735.9  6.539 0.01345 *
Residuals 53  5964  112.5
---

```

```

Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ## Normality
> shapiro.test(mod1_new$residuals) # rejeitou

```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: mod1_new$residuals
W = 0.93513, p-value = 0.00484
```

```
> #Homogeneity of variance
> leveneTest(mod1_new$residuals ~ Tipo_cel, data = newdat)# rejeitou
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value  Pr(>F)
group 1 12.319 0.0009129 ***
  54
```

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> leveneTest(mod1_new$residuals ~ Tipo_sup, data = newdat) # rejeitou
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value  Pr(>F)
group 1  7.2325 0.009504 **
  54
```

Modelo sem Tipo_sup

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> mod1_new <- aov(Nrinfec ~ Tipo_cel + Tempo, data = newdat)
> mod1_new
Call:
  aov(formula = Nrinfec ~ Tipo_cel + Tempo, data = newdat)
```

Terms:

	Tipo_cel	Tempo	Residuals
Sum of Squares	888.018	1332.357	5367.607
Deg. of Freedom	1	6	48

Residual standard error: 10.57474

Estimated effects may be unbalanced

```
> summary(mod1_new)
  Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tipo_cel  1  888  888.0  7.941 0.0070 **
Tempo    6 1332  222.1  1.986 0.0862 .
Residuals 48 5368  111.8
```

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ## Normality
> shapiro.test(mod1_new$residuals) # rejeitou
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: mod1_new$residuals
W = 0.90542, p-value = 0.000341
```

Modelo só com celula

```
> mod1_new <- aov(Nrinfec ~ Tipo_cel, data = newdat)
> mod1_new
Call:
  aov(formula = Nrinfec ~ Tipo_cel, data = newdat)
```

Terms:

```
          Tipo_cel Residuals
Sum of Squares  888.018 6699.964
Deg. of Freedom    1    54
```

Residual standard error: 11.13882
Estimated effects may be unbalanced

```
> summary(mod1_new)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tipo_cel  1  888  888.0  7.157 0.00986 **
Residuals 54 6700  124.1
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> ## Normality
> shapiro.test(mod1_new$residuals) # rejeitou
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: mod1_new$residuals
W = 0.88933, p-value = 9.425e-05
```

Test-t

Tipo_sup	Tipo_cel	n	mean	sd
BSA	DH82	21	69,43	46,98
BSA	Macrófago	21	142,29	70,07
SFB	DH82	21	39,62	23,15
SFB	Macrófago	21	133,90	84,06

