

Rafael Moysés Salgado

Papel do componente C5 do sistema complemento no
controle da infecção por *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Maria Álvarez Mosig

Versão original

São Paulo
2019

RESUMO

SALGADO, R. M. **Papel do componente C5 do sistema complemento no controle da Infecção por *Trypanosoma cruzi***. 2019. 66 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A resposta imune frente ao *T. cruzi* é baseada no desenvolvimento de um perfil de resposta Th1, com alta produção de IFN- γ , citocina que possui papel crucial na ativação dos macrófagos, estimulando a produção de óxido nítrico, reativo tóxico para microrganismos intracelulares. A ação do óxido nítrico e seu efeito citotóxico contra o *T. cruzi* não está completamente esclarecido, mas indica-se que o mesmo seja capaz de interferir diretamente no metabolismo do parasita, como por exemplo, inibindo a atividade da enzima cruzipaina, cuja atividade está diretamente relacionada com a infectividade, virulência, evasão do sistema imune e proliferação intracelular do parasita. Esta cisteína protease induz a clivagem da proteína C5 do sistema complemento, liberando a anafilatoxina C5a, que exercerá seus efeitos pela ligação de alta afinidade com o receptor para C5a (C5aR), altamente expresso em leucócitos, assim como em células endoteliais e epiteliais. A convergência da ação destes receptores (através da detecção de sinais de dano), induz uma forte sinalização pró-inflamatória capaz de modular a imunidade inata e adaptativa frente ao *T. cruzi*. O papel do C5, como elemento eventualmente envolvido na detecção do dano ocasionado pelo *T. cruzi* nas primeiras semanas de infecção e o eventual impacto deste fator na intensidade e qualidade da resposta imune frente ao *T. cruzi* foi o alvo deste estudo. Para determinar isso, utilizamos parasitas Y obtidos de repique em camundongos AJ tratados com ciclofosfamida (para impedir a produção de anticorpos) para infecção de camundongos C5 deficientes (C5-) e camundongos C5 suficientes (C5+), afim de avaliar a participação de C5 na remoção dos parasitas, acompanhamos a parasitemia logo após a infecção e não observamos qualquer diferença na saída dos parasitas da circulação, ambos estando negativos após 2 horas. Seguindo a infecção, observamos a sustentação de uma maior parasitemia durante os primeiros dias de infecção em camundongos C5-, indicando a participação do C5 no controle na carga parasitária. Apesar disso, não encontramos diferença significativa no desenvolvimento da resposta celular e humoral nestes camundongos, apresentando níveis equiparados ou elevados, tanto no número de linfócitos (provavelmente associado a maior carga parasitária) e como na titulação de anticorpos totais e específicos anti-*T. cruzi*, quando comparados aos camundongos C5+. Visando um modelo mais controlado, passamos para a análise *in vitro*, na qual observamos um menor índice de internalização (3 horas após infecção) e maior proliferação de parasitas (ao final de 48 horas) em macrófagos mantidos em cultura na presença de soro proveniente de camundongos C5-. Coletivamente, nossos resultados indicam a importância do componente C5 na resposta imune contra o parasita *Trypanosoma cruzi*, mediando processos de internalização, ativação e conferência de proteção ao indivíduo infectado.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Sistema Complemento. Macrófagos. C5. Doença de Chagas.

ABSTRACT

SALGADO, R. M. **Role of the C5 component of the complement system in the *Trypanosoma cruzi* infection control.** 2019. 66 p. Doctoral thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The immune response to *T. cruzi* is characterized by development of Th1 profile response, mark by high levels of IFN- γ , a cytokine that plays a crucial role in the macrophages activation by stimulating nitric oxide production, a toxic reactive for intracellular microorganisms. The action of nitric oxide and its cytotoxic effect against *T. cruzi* is not fully understood, but it is indicated that it is able to directly interfere in the metabolism of the parasite, for example, by inhibiting the activity of the cruzipain enzyme, whose activity is directly related to infectivity, virulence, immune system evasion and intracellular parasite proliferation. This cysteine protease induces cleavage of the C5 protein from the complement system, releasing the anaphylatoxin C5a, which will execute its effects by the high affinity binding to the receptor for C5a (C5aR), highly expressed in leukocytes, as well as in endothelial and epithelial cells. The convergence of these receptors (through the detection of signs of damage), induces a strong pro-inflammatory signaling capable of modulating the innate and adaptive immunity against *T. cruzi*. The role of C5 as an element involved in detecting the damage caused by *T. cruzi* in the first weeks of infection and the possible impact of this factor on the intensity and quality of the immune response to *T. cruzi* was the aim of this study. To determine this, we used parasites (Y strain) obtained from AJ mice treated with cyclophosphamide (to prevent the production of antibodies) and infected C5 deficient mice (C5-) and C5 sufficient mice (C5 +), in order to evaluate the participation of C5 in C5 removal of parasites. We followed the parasitemia soon after infection and did not observe any difference in the exit of the parasites from the circulation, both groups being negative after 2 hours. Following the infection, we observed a greater parasitemia persistence during the first days of infection in C5- mice, indicating the C5 participation in parasitic load control. Nevertheless, we found no significant difference in the development of the cellular and humoral response in these mice, presenting similar or elevated levels, both in the number of lymphocytes (probably associated with higher parasite load) and in the total and specific anti-*T. cruzi* antibodies levels, when compared to the C5+ mice. Aiming at a more controlled model, we proceeded to the *in vitro* analysis, in which we observed a lower internalization index (3 hours after infection) and a greater proliferation of parasites (at the end of 48 hours) in macrophages maintained in culture in the presence of serum from C5- mice. Collectively, our results indicate the importance of the C5 component in the immune response against the parasite *Trypanosoma cruzi*, mediating processes of internalization, activation and conferring protection to the infected individual.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Complement System. Macrophages. C5. Chagas disease.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

O protozoário flagelado *Trypanosoma Cruzi* é o causador da Doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana (BESTETTI et al., 2016); esta, considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas (HOTEZ et al., 2016), afeta cerca de 6 a 7 milhões de pessoas (WHO, 2016). Descoberta em 1909 pelo brasileiro Carlos Chagas, (CHAGAS, 1909) atualmente, o controle da infecção por *T. cruzi* e a DC ainda sofre com métodos fracos de diagnóstico, opções para tratamento de eficácia duvidosa e ausência de vacinas para prevenção (TARLETON, 2016), indicando a relevância da continuidade de estudos científicos.

Até recentemente, limitada às áreas endêmicas (Américas do Sul e Central), a DC abrangia em sua maioria a população rural, devido às condições de moradia inapropriadas em regiões menos favorecidas economicamente (MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015b). Entretanto, o influxo recente de imigrantes com origem em países endêmicos, tem transformado a DC em um problema global de saúde que afeta Estados Unidos e o Canadá, assim como vários países da Europa, além de Japão e Austrália (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Classicamente, a infecção por *T. cruzi* ocorre na interação entre o homem e vetores, insetos hospedeiros do parasita que pertencem à família Reduviidae, subfamília Triatominae, tais como *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus*, conhecidos no Brasil como barbeiros (COURA, 2015). Além da transmissão vetorial, a infecção pode ocorrer por transfusão sanguínea (BENJAMIN et al., 2012), transmissão congênita (CAMPOS-VALDEZ et al., 2016), transplante de órgãos e/ou medula óssea de doadores infectados (GOMEZ; MANTILLA; RODRIGUEZ-MORALES, 2014), além de pela ingestão de alimentos e bebidas contaminadas (DE NOYA; GONZALEZ, 2015), e em casos raros, por acidentes de laboratório. Com o sucesso de programas visando o controle de vetores, screening rigoroso nos bancos de sangue e a educação da população em risco, os números de infecção caíram consideravelmente nas últimas décadas (RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

As manifestações clínicas da doença variam significativamente entre os indivíduos. A fase aguda, frequentemente assintomática, é caracterizada pela ocorrência de parasitemia (presença de tripanossomas no sangue, revelado por microscopia) (MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015a), e quando sintomática, pode apresentar inflamação no local da picada do inseto (chagoma de inoculação na região palpebral), febre, mal-estar, linfadenopatia, arritmias cardíacas e anormalidades eletrocardiográficas (alterações normalizadas espontaneamente após 4-8 semanas) (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010), em menos de 5% dos indivíduos infectados, casos mais graves podem apresentar miocardite ou meningoencefalite (MATTU et al., 2013). Contudo, o controle do parasita não é totalmente eficiente, em tal forma que a infecção se perpetua por toda a vida do hospedeiro.

Na cronicidade, a maioria dos indivíduos permanece na forma indeterminada da doença, fase não sintomática e sem indução de lesões sérias, que mesmo com a perpetuação do parasita, possui um excelente prognóstico (RIBEIRO et al., 2012). Aproximadamente 30% dos infectados progridem para a fase sintomática, podendo apresentar alterações cardíacas e/ou digestivas (megaesôfago ou megacólon), ou raramente, uma associação entre as ambas (LARA ROMERO; FERREIRO ARGUELLES; ROMERO PEREZ, 2016). A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é geralmente detectada décadas após o início da infecção, sendo caracterizada pela presença de arritmia, insuficiência cardíaca, bloqueios de ramo atrioventricular e tromboembolismo. É considerada a manifestação clínica mais significativa da doença, por sua frequência e gravidade, e pode até mesmo, levar à morte súbita (BERN, 2015).

A terapia anti-parasita com Benznidazol e Nifurtimox constitui o único tratamento aprovado e encontra-se longe do ideal, apresentando pouca efetividade durante a fase crônica da infecção, alta toxicidade em adultos, além de diferente suscetibilidade às cepas de *T. cruzi* (BERMUDEZ et al., 2016).

1.2 *Trypanosoma cruzi*

O ciclo deste parasita é bastante complexo, abrangendo estágios de desenvolvimento tanto nos hospedeiros vertebrados (mamíferos, como humanos,

gambás e cachorros) e nos invertebrados (insetos hematófagos, como o barbeiro) (ROMANO et al., 2012).

O triatomíneo é infectado ao sugar o sangue de mamíferos contendo parasitas circulantes (tripomastigotas). Após a ingestão, ao atingir a porção média do intestino do inseto, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas (CHAGAS, 1909), forma enriquecida em enzimas metabólicas, sem grande potencial de invasão celular e que se replicam por divisão binária (LIMA et al., 2010). Posteriormente, no intestino grosso do vetor, os epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos infectantes que são depositados nas fezes durante a próxima alimentação (MACHADO et al., 2012). Esta forma do parasita é recoberta com proteínas de superfície, como transialidases (GP82 e 90) que estão associadas à invasão de células do hospedeiro e evasão da resposta desenvolvida pelo sistema imune (LIMA et al., 2010).

Uma vez no interior do hospedeiro vertebrado, o parasita pode infectar diferentes tipos celulares, como macrófagos, fibroblastos e células da musculatura lisa e/ou estriada. Após a invasão, os tripomastigotas metacíclicos precisam sobreviver e escapar do ambiente altamente oxidativo encontrado dentro do fagossomo para estabelecer a infecção (MACHADO-SILVA et al., 2016). Desta forma, os parasitas escapam do fagolisossoma para o citoplasma, diferenciando-se em amastigotas, forma replicativa do hospedeiro vertebrado. Após diversos ciclos de divisão, os amastigotas se transformam em tripomastigotas sanguíneos, que são liberados na ruptura das células. Ao acessar a corrente sanguínea, as formas tripomastigotas disseminam para outros tecidos, mas também, podem ser ingeridas pelo vetor, no seu repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo. (CHAGAS, 1909) (OSORIO et al., 2012).

O *T. cruzi* possui uma grande diversidade genética e cepas bastante heterogêneas, explicando parcialmente as distintas manifestações clínicas da doença e as diferenças geográficas nos números de morbidade e mortalidade (MACEDO et al., 2004) (RASSI et al., 2010). A variabilidade deste parasita tem sido amplamente estudada (POSTAN; MCDANIEL; DVORAK, 1987) (LEWIS et al., 2009) (ZINGALES et al., 2012) (BRENIERE; WALECKX; BARNABE, 2016) e atualmente, se encontram divididos em 6 grupos filogenéticos (TcI à VI), considerando a análise da expressão de proteínas específicas e marcadores genéticos (SECO-HIDALGO; DE PABLOS; OSUNA, 2015). Os grupos TcI (predominante no ciclo de transmissão

silvestre em áreas endêmicas) e o Tc II (encontrado no ambiente doméstico em países da América do sul), são os de maior relevância. (ZINGALES et al., 2009).

Neste projeto de doutorado, utilizamos parasitas do clone *Sylvio X10/4* (grupo Tc I), (POSTAN; DVORAK; MCDANIEL, 1983), de baixa virulência e conhecido por seu miotropismo, que promovem uma infecção sem parasitemia patente em camundongos normais, mas podem determinar um quadro de miocardite crônica em camundongos da linhagem C3H/HePAS, similar à miocardiopatia chagásica crônica em humanos (MARINHO et al., 2009). Em contraste, parasitas da cepa Y (grupo Tc II) (SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, 1953) que exibem alta virulência, são reticulotrópicos (MARINHO et al., 1999) e promovem uma infecção com parasitemia patente, também serão utilizados para o estudo do papel do C5 no início da infecção.

1.3 Resposta imune ao *T. cruzi*

A resposta inata frente a patógenos intracelulares como o *T. cruzi* envolve a detecção dos parasitas pelos PRRs (receptores padrões de reconhecimento), como TLRs (receptores semelhantes à Toll) e NLRs (receptores semelhantes à NOD) (DOS-SANTOS et al., 2016), que estão presentes nas células do sistema imune inato, como macrófagos (capazes de eliminar os parasitas de acordo com seu nível de ativação) e células dendríticas (responsáveis pela captura, processamento e apresentação do antígeno para estimulação e desenvolvimento da resposta imune adquirida) (TARLETON, 2007).

Células da imunidade inata são cruciais no controle da replicação e propagação do parasita, tanto na fase aguda quanto crônica da DC (JUNQUEIRA et al., 2010), produzindo mediadores pró-inflamatórios como a interleucina-12 (IL-12), o fator de necrose tumoral (TNF- α) e mediadores efetores como proteases, radicais de oxigênio e óxido nítrico (NO). (CARDILLO et al., 2015). Além disto, a IL-12 é um mediador chave na ativação de células natural killer (NK) e na diferenciação das células T CD4+ para o fenótipo Th1, perfil que resulta na produção de IFN- γ (GUILMOT et al., 2013) (ABEL et al., 2014), citocina que, pela sua vez, possui papel crucial na ativação dos macrófagos, estimulando a produção de NO, reativo tóxico para microorganismos intracelulares (KAYAMA; TAKEDA, 2010) (STAHL et al., 2014). Estudos demonstraram que ratos infectados com parasitas da cepa Y de *T.*

cruzi apresentam um aumento dos monócitos no sangue periférico até o 12º dia de infecção e a depleção de macrófagos pelo tratamento com sílica causa aumento significativo no número de ninhos de amastigostas (MELO; MACHADO, 2001).

A importância do óxido nítrico no controle da infecção é apoiada pela observação dos animais C57BL/6 iNOS^{-/-} infectados com parasitas das cepas Colombiana ou Y de *T. cruzi* desenvolverem um maior número de ninhos no tecido cardíaco quando comparados aos camundongos normais (BORGES et al., 2009). O mecanismo pelo qual o NO realiza seu efeito citotóxico contra o *T. cruzi* não está completamente esclarecido, mas indica-se que o NO seja capaz de interferir diretamente no metabolismo do parasita, como por exemplo, pode inibir a atividade da enzima cruzipaina, que possui importante papel na nutrição e no processo de invasão celular pelo *T. cruzi* (VENTURINI et al., 2000).

Como citado acima, o reconhecimento do parasita ocorre na interação entre os PRRs dos macrófagos com os PAMP's (padrões moleculares associados a patógenos) do *T. cruzi*. Dentre os PRR's estudados, os receptores TLR2 e TLR9 (GRAVINA et al., 2013), TLR4 (OLIVEIRA et al., 2010), o NOD1 (SILVA, G. K. et al., 2010) e o inflamossomo NLRP3 (GONCALVES et al., 2013) (SILVA, G. K.; COSTA; et al., 2013) possuem participação importante no reconhecimento deste parasita. Os receptores do tipo Toll, com exceção do TLR3, induzem a produção de citocinas dependente da indução do fator nuclear de transcrição (NF-κB), em um circuito de ativação que opera através da molécula adaptadora "fator de diferenciação mieloide 88" (MyD88) (TRINCHIERI; SHER, 2007).

As âncoras GPI (glico-inositol-fosfolipídio), glicoproteínas distribuídas por toda a superfície de membrana do parasita, assim como a proteína Tc52, são fortes indutores de TLR2 e TLR4 (RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012). TLR9, receptor intracelular, é ativado através do reconhecimento de oligodesoxinucleotídeos não metilados (CpG) encontrados de forma abundante no genoma do *T. cruzi* (KAYAMA; TAKEDA, 2010). O reconhecimento combinado de diferentes TLRs pode determinar a resposta: camundongos deficientes em TLR2 e TLR9 apresentam maior suscetibilidade à infecção e aumento de carga parasitária quando comparados a camundongos selvagens ou deficientes exclusivamente de TLR2 ou TLR9. (BAFICA et al., 2006)

A ação fundamental na defesa contra o *T. cruzi*, é a indução de uma forte e persistente resposta Th1 (HOFT; EICKHOFF, 2005) (JUNQUEIRA et al., 2010). A

sinalização por células dendríticas leva à diferenciação e expansão clonal de células T helper CD4⁺, e indiretamente contribui à ativação de células T CD8⁺ e células B (TARLETON, 2007). O IFN- γ produzido pelos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativam os mecanismos efetores em macrófagos levando a destruição de tripomastigotas fagocitados e amastigotas em replicação, enquanto a atividade citotóxica das células T CD8⁺ resulta na destruição de células infectadas (MARINHO et al., 2007). Pela sua vez, anticorpos produzidos pelas células B podem induzir a lise do parasita ou facilitar a fagocitose de formas tripomastigotas extracelulares, pela opsonização por IgG e interação com receptores Fc encontrados em macrófagos, mecanismo este, responsável pelo controle da parasitemia após o pico de infecção (KRETTLI; BRENER, 1976) (UMEKITA; TAKEHARA; MOTA, 1988) (UMEKITA; MOTA, 2000).

Apesar da ativação da resposta imune estar associada à proteção, o fato de não levar a uma destruição da totalidade dos parasitas, faz com que também contribua à patogênese da doença devido à destruição tissular que resulta da perpetuação de uma reação inflamatória exacerbada (LEWIS; KELLY, 2016) .

1.3.1 Sistema complemento

O Sistema Complemento (SC) é composto por proteínas plasmáticas produzidas principalmente pelo fígado, que se associam em uma cascata enzimática envolvendo uma série de clivagens, levando a opsonização e/ou lise dos patógenos, além de induzir uma série de respostas inflamatórias para combater a infecção (FREELEY; KEMPER; LE FRIEC, 2016).

O sistema pode ser iniciado em três diferentes vias: clássica, das lectinas e alternativa, porém, todas convergem em uma via comum que resulta em: a) opsonização, ou seja, facilitação da fagocitose de antígenos recobertos por fragmentos C3b ou iC3b; b) formação do complexo de ataque a membrana (MAC), com geração de poros na membrana celular que promovem a lise osmótica da célula sobre a qual tais estruturas se formaram (MERLE; CHURCH; et al., 2015) e c) geração de anafilatoxinas (C3a, C4a e C5a), pequenos fragmentos de proteínas do complemento liberados durante o processo de ativação do sistema, que possuem atividade pró-inflamatória potente, tais como: recrutamento celular, degranulação de mastócitos, e indução do stress oxidativo em macrófagos, eosinófilos e neutrófilos (MERLE; NOE; et al., 2015). Fragmentos C3a e C5a são constantemente liberados

durante a ativação do SC e possuem papel fundamental na ativação de células que expressam receptores para estes produtos (SEYA; HOLERS; ATKINSON, 1985) (HOLERS, 2014).

1.3.2 *T. cruzi* e o sistema complemento

No início da infecção pelo *T. cruzi*, as formas extracelulares tripomastigotas escapam da lise mediada pelo complemento evitando a ativação do complemento pela via alternativa (KIPNIS; DA SILVA, 1989). Isto é em parte devido à expressão na superfície do parasita de uma proteína reguladora do complemento (T-DAF), com função semelhante à do fator de aceleração do decaimento do complemento humano (DAF), que impede e ou limita a montagem eficiente das C3 convertases de ambas as vias alternativa e clássica (TAMBOURGI et al., 1995). Além disso, outras proteínas regulatórias do complemento (CRP's) estão ancoradas nas formas tripomastigotas e também inibem a ativação das vias acima (NORRIS et al., 1991).

Logo após a ativação policlonal do sistema imune que ocorre no início da infecção, acontece o desenvolvimento da resposta humoral específica formada por anticorpos IgM e IgG anti-*T. cruzi* que irão promover a remoção das formas extracelulares do parasita (tripomastigotas) do sangue (UMEKITA et al., 1988) e tecidos. A eficiência desta ação depende da ativação do sistema complemento, visto que a depleção de C3 reduz consideravelmente a retirada dos parasitas do sangue quando induzida pela presença de soro imune anti-*T. cruzi* (UMEKITA; MOTA, 1989). Até o momento, pouco se sabe sobre a capacidade protetora induzida por C5a, fragmento que resulta da clivagem do fator C5 após a ativação da molécula C3.

1.3.3 *T. cruzi* e o componente C5

Além da ativação de C5 pelas C5-convertases geradas na ativação do complemento pelas vias clássica, alternativa e das lectinas, tem sido descrita a clivagem direta de C5 pela ação enzimática de enzimas liberadas no dano tissular, resultado de eventos nocivos (de origem infecciosa ou não). Desta maneira, o SC pode atuar como um sensor de dano, que ao interagir com os receptores para C5a em diferentes células, cria uma rede tradutora dos sinais de dano, liberando sinais capazes de modular a resposta imune inata e adquirida. Essa habilidade é crítica

para a articulação da resposta inflamatória em decorrência ao dano tissular ou contra patógenos (KOHL, 2006). A ausência da anafilatoxina C5a tem sido relacionada a disfunções pulmonares mediadas por leucócitos, pneumonia bacteriana, fibrose cística, doenças pulmonares crônicas e na patogênese de lesões ateroscleróticas. (HAVILAND et al., 1995).

C5a exerce seus efeitos através da ligação de alta afinidade com o receptor C5a (C5aR) (BOULAY et al., 1991) e um segundo receptor, C5L2 ou C5ar2, com função ainda não muito esclarecida. (OHNO et al., 2000). C5aR é altamente expresso em leucócitos, incluindo neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos, assim como em linfócitos, células endoteliais e epiteliais, porém em menor quantidade (MONK et al., 2007).

C5aR desempenha um papel essencial na regulação da atividade das células T, descritas em modelos experimentais de encefalomielite autoimune (LIU et al., 2008), asma alérgica (KOHL et al., 2006) e infecções virais (FANG et al., 2007). O mecanismo exato pelo qual o C5a impacta na resposta de células T ainda é desconhecido, porém, acredita-se que C5a atuaria diretamente em células APC e células T, regulando a internalização de antígenos, expressão de moléculas coestimulatórias, e na expansão e diferenciação das próprias células T. (DUNKELBERGER et al., 2012)

Durante o processo de tentativa de invasão nas células do hospedeiro, tripomastigotas de *T. cruzi* secretam moléculas, como por exemplo, a cruzipaina, uma cisteína protease, cuja atividade está diretamente relacionada com a infectividade, virulência, evasão do sistema imune e proliferação intracelular do parasita (MEIRELLES et al., 1992) (SAN FRANCISCO et al., 2016) (AGUILERA et al., 2016). Devido a esta importância, a cruzipaina é alvo de diversos estudos que visam o desenvolvimento de alternativas terapêuticas. (BRANQUINHA et al., 2015) (SBARAGLINI et al., 2016) (CERNY et al., 2016).

A cruzipaina age em um cininogênio ligado a membrana celular e gera bradicinina, que ao interagir com o receptor de bradicinina B₂ (B₂R), induz a mobilização de Ca²⁺ necessária para a internalização do parasita, propagando a infecção (SCHARFSTEIN et al., 2000). Recentemente, foi mostrado que, além da liberação de bradicinina nos locais de infecção, a cruzipaina induz a clivagem da proteína C5, liberando a anafilatoxina C5a. A convergência da ação dos receptores C5ar/B₂R (através da detecção de sinais de dano), induz uma forte sinalização pró-

inflamatória capaz de modular a imunidade inata e adaptativa frente ao *T.cruzi*. (SCHMITZ et al., 2014).

O papel do C5, como elemento envolvido na detecção do dano ocasionado pelo *T. cruzi* no início da infecção e o eventual impacto deste fator na intensidade e qualidade da resposta imune frente ao *T. cruzi* é o alvo de estudo deste projeto.

CONCLUSÃO

Ao decorrer da infecção, o componente C5 mostra-se importante para a proteção ao hospedeiro, induzindo alta mortalidade aos camundongos deficientes; fenômeno que não está associado a um déficit de resposta linfocitária e/ou humoral. A participação de C5 é essencial para uma ótima internalização e controle da replicação do *T. cruzi* por células fagocíticas, demonstrado em modelo *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS*

ABEL, L. C. et al. Induction of IL-12 production in human peripheral monocytes by *Trypanosoma cruzi* is mediated by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins and potentiated by IFN- γ and CD40-CD40L interactions. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 345659, 2014.

AGUILERA, E. et al. Potent and Selective Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Triosephosphate Isomerase with Concomitant Inhibition of Cruzipain: Inhibition of Parasite Growth through Multitarget Activity. v. 11, n. 12, p. 1328-38, Jun 20 2016.

ALIBERTI, J. et al. Cutting edge: bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization. **J Immunol**, v. 170, n. 11, p. 5349-53, Jun 1 2003.

BAFICA, A. et al. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 177, n. 6, p. 3515-9, Sep 15 2006.

BAVIA, L. et al. Basal physiological parameters of two congenic mice strains: C5 deficient C57BL/6 and C5 sufficient A/J. **Immunol Lett**, v. 159, n. 1-2, p. 47-54, May-Jun 2014.

BENJAMIN, R. J. et al. *Trypanosoma cruzi* infection in North America and Spain: evidence in support of transfusion transmission. **Transfusion**, v. 52, n. 9, p. 1913-21; quiz 1912, Sep 2012.

BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Trop**, v. 156, p. 1-16, Apr 2016.

BERN, C. Chagas' Disease. **N Engl J Med**, v. 373, n. 5, p. 456-66, Jul 30 2015.

BESTETTI, R. B. et al. Could Carlos Chagas' assumption on the relationship between goiter and chronic Chagas heart disease be correct? A historical reappraisal. **Int J Cardiol**, v. 202, p. 410-2, Jan 1 2016.

BORGES, C. R. et al. [Role of nitric oxide in the development of cardiac lesions during the acute phase of experimental infection by *Trypanosoma cruzi*]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 2, p. 170-4, Mar-Apr 2009.

BOULAY, F. et al. Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on differentiated HL-60 cells. **Biochemistry**, v. 30, p. 2993-2999, 1991.

BRANQUINHA, M. H. et al. Cruzipain: An Update on its Potential as Chemotherapy Target against the Human Pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Curr Med Chem**, v. 22, n. 18, p. 2225-35, 2015.

BRENIERE, S. F.; WALECKX, E.; BARNABE, C. Over Six Thousand Trypanosoma cruzi Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 8, p. e0004792, Aug 2016.

CAMPOS-VALDEZ, G. et al. [Maternal-fetal transmission of Trypanosoma cruzi, a health problem slightly studied in Mexico: case Chiapas]. **Salud Publica Mex**, v. 58, n. 3, p. 378-84, Jun 2016.

CARDILLO, F. et al. Immunity and immune modulation in Trypanosoma cruzi infection. **Pathog Dis**, v. 73, n. 9, p. ftv082, Dec 2015.

CERNY, N. et al. Coadministration of cruzipain and GM-CSF DNAs, a new immunotherapeutic vaccine against Trypanosoma cruzi infection. **Hum Vaccin Immunother**, v. 12, n. 2, p. 438-50, 2016.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277-82, May 2015.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 5-13, Jul-Aug 2010.

DE NOYA, B. A.; GONZALEZ, O. N. An ecological overview on the factors that drives to Trypanosoma cruzi oral transmission. **Acta Trop**, v. 151, p. 94-102, Nov 2015.

DOS-SANTOS, A. L. et al. Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections. **Exp Parasitol**, v. 167, p. 67-75, Aug 2016.

DUNKELBERGER, J. et al. C5aR expression in a novel GFP reporter gene knockin mouse: implications for the mechanism of action of C5aR signaling in T cell immunity. **J Immunol**, v. 188, n. 8, p. 4032-42, Apr 15 2012.

FANG, C. et al. Complement-dependent enhancement of CD8+ T cell immunity to lymphocytic choriomeningitis virus infection in decay-accelerating factor-deficient mice. **J Immunol**, v. 179, n. 5, p. 3178-86, Sep 1 2007.

FREELEY, S.; KEMPER, C.; LE FRIEC, G. The "ins and outs" of complement-driven immune responses. **Immunol Rev**, v. 274, n. 1, p. 16-32, Nov 2016.

GOMEZ, P. C.; MANTILLA, H. J.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Fatal chagas disease among solid-organ transplant recipients in Colombia. **Open Forum Infect Dis**, v. 1, n. 1, p. ofu032, Mar 2014.

GONCALVES, V. M. et al. NLRP3 controls Trypanosoma cruzi infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 10, p. e2469, 2013.

GRAVINA, H. D. et al. Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with Trypanosoma cruzi. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63100, 2013.

GUILMOT, A. et al. Monocytes play an IL-12-dependent crucial role in driving cord blood NK cells to produce IFN-g in response to Trypanosoma cruzi. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 6, p. e2291, 2013.

HAVILAND, D. L. et al. Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. **J Immunol**, v. 154, n. 4, p. 1861-9, Feb 15 1995.

HOFT, D. F.; EICKHOFF, C. S. Type 1 immunity provides both optimal mucosal and systemic protection against a mucosally invasive, intracellular pathogen. **Infect Immun**, v. 73, n. 8, p. 4934-40, Aug 2005.

HOLERS, V. M. Complement and its receptors: new insights into human disease. **Annu Rev Immunol**, v. 32, p. 433-59, 2014.

HOTEZ, P. J. et al. Eliminating the Neglected Tropical Diseases: Translational Science and New Technologies. **PLoS Negl Trop Dis**, 2016.

JI, M. et al. C5a Induces the Synthesis of IL-6 and TNF-alpha in Rat Glomerular Mesangial Cells through MAPK Signaling Pathways. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0161867, 2016.

JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Rev Mol Med**, v. 12, p. e29, Sep 15 2010.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection. **Microbes Infect**, v. 12, n. 7, p. 511-7, Jul 2010.

KIM, A. H. et al. Complement C5a receptor is essential for the optimal generation of antiviral CD8+ T cell responses. **J Immunol**, v. 173, n. 4, p. 2524-9, Aug 15 2004.

KIPNIS, T. L.; DA SILVA, W. D. Evasion of Trypanosoma cruzi from complement lysis. **Braz J Med Biol Res**, v. 22, n. 1, p. 1-16, 1989.

KOHL, J. Self, non-self, and danger: a complementary view. **Adv Exp Med Biol**, v. 586, p. 71-94, 2006.

KOHL, J. et al. A regulatory role for the C5a anaphylatoxin in type 2 immunity in asthma. **J Clin Invest**, v. 116, n. 3, p. 783-96, Mar 2006.

KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infections. **J Immunol**, v. 116, n. 3, p. 755-60, Mar 1976.

LARA ROMERO, C.; FERREIRO ARGUELLES, B.; ROMERO PEREZ, E. Acute colonic complications in a patient with Chagas disease. **Rev Esp Enferm Dig**, v. 108, Apr 29 2016.

LEWIS, M. D.; KELLY, J. M. Putting Infection Dynamics at the Heart of Chagas Disease. **Trends Parasitol**, Sep 6 2016.

LEWIS, M. D. et al. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in Trypanosoma cruzi populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 12, p. 1305-17, Oct 2009.

LIMA, F. M. et al. The challenge of Chagas' disease: has the human pathogen, Trypanosoma cruzi, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? **N Biotechnol**, v. 27, n. 6, p. 837-43, Dec 31 2010.

LIU, J. et al. IFN-gamma and IL-17 production in experimental autoimmune encephalomyelitis depends on local APC-T cell complement production. **J Immunol**, v. 180, n. 9, p. 5882-9, May 1 2008.

MACEDO, A. M. et al. Trypanosoma cruzi: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 1-12, Feb 2004.

MACHADO-SILVA, A. et al. How Trypanosoma cruzi deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways. **Mutat Res Rev Mutat Res**, v. 767, p. 8-22, Jan-Mar 2016.

MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 6, p. 753-70, Nov 2012.

MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. Chagas Heart Disease: An Update. **Am J Med**, v. 128, n. 11, p. 1251.e7-9, Nov 2015a.

_____. The Epidemiology, Clinical Manifestations, and Management of Chagas Heart Disease. **Clin Cardiol**, v. 38, n. 9, p. 565-9, Sep 2015b.

MARINHO, C. R. et al. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. **Infect Immun**, v. 67, n. 1, p. 308-18, Jan 1999.

MARINHO, C. R. et al. Infection by the Sylvio X10/4 clone of *Trypanosoma cruzi*: relevance of a low-virulence model of Chagas' disease. **Microbes Infect**, v. 11, n. 13, p. 1037-45, Nov 2009.

MARINHO, C. R. et al. IFN-gamma, but not nitric oxide or specific IgG, is essential for the in vivo control of low-virulence Sylvio X10/4 *Trypanosoma cruzi* parasites. **Scand J Immunol**, v. 66, n. 2-3, p. 297-308, Aug-Sep 2007.

MATTU, U. K. et al. The assassin: Chagas cardiomyopathy. **Am J Med**, v. 126, n. 10, p. 864-7, Oct 2013.

MEIRELLES, M. N. et al. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. **Mol Biochem Parasitol**, v. 52, n. 2, p. 175-84, Jun 1992.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J Parasitol**, v. 64, n. 3, p. 475-82, Jun 1978.

MELO, R. C.; MACHADO, C. R. *Trypanosoma cruzi*: peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats. **Exp Parasitol**, v. 97, n. 1, p. 15-23, Jan 2001.

MERLE, N. S. et al. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. **Front Immunol**, v. 6, p. 262, 2015.

MERLE, N. S. et al. Complement System Part II: Role in Immunity. **Front Immunol**, v. 6, p. 257, 2015.

MONK, P. N. et al. Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. **Br J Pharmacol**, v. 152, n. 4, p. 429-48, Oct 2007.

MONTEIRO, A. C. et al. Bradykinin B2 Receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically released by *Trypanosoma cruzi*, are critical for the development of protective type-1 responses. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 11, p. e185, Nov 2007.

NORRIS, K. A. et al. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. **J Immunol**, v. 147, n. 7, p. 2240-7, Oct 1 1991.

OHNO, M. et al. A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. **Mol Immunol**, v. 37, n. 8, p. 407-12, Jun 2000.

OLIVEIRA, A. C. et al. Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8+ T cell responses against *Trypanosoma cruzi* in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 4, p. e1000870, Apr 29 2010.

OSORIO, L. et al. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? **Microbes Infect**, v. 14, n. 15, p. 1390-402, Dec 2012.

POSTAN, M.; DVORAK, J. A.; MCDANIEL, J. P. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. I. A comparison of the course of infection of C3H/HEN- mice with two clones isolated from a common source. **Am J Trop Med Hyg**, v. 32, n. 3, p. 497-506, May 1983.

POSTAN, M.; MCDANIEL, J. P.; DVORAK, J. A. Comparative studies of the infection of Lewis rats with four *Trypanosoma cruzi* clones. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 81, n. 3, p. 415-9, 1987.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, n. 2, p. 275-91, Jun 2012.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 17 2010.

RIBEIRO, A. L. et al. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nat Rev Cardiol**, v. 9, n. 10, p. 576-89, Oct 2012.

RICKLIN, D. et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nat Immunol**, v. 11, n. 9, p. 785-97, Sep 2010.

RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. **J Parasitol Res**, v. 2012, p. 507874, 2012.

ROMANO, P. S. et al. Molecular and cellular mechanisms involved in the *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay. **IUBMB Life**, v. 64, n. 5, p. 387-96, May 2012.

SAN FRANCISCO, J. et al. Decreased cruzipain and gp85/trans-sialidase family protein expression contributes to loss of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote virulence. **Microbes Infect**, Aug 20 2016.

SARDINHA, L. R. et al. The liver plays a major role in clearance and destruction of blood trypomastigotes in *Trypanosoma cruzi* chronically infected mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 1, p. e578, Jan 05 2010.

SBARAGLINI, M. L. et al. Novel cruzipain inhibitors for the chemotherapy of chronic Chagas disease. **Int J Antimicrob Agents**, v. 48, n. 1, p. 91-5, Jul 2016.

SCHARFSTEIN, J. et al. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. **J Exp Med**, v. 192, n. 9, p. 1289-300, Nov 6 2000.

SCHARFSTEIN, J. et al. Kininogens coordinate adaptive immunity through the proteolytic release of bradykinin, an endogenous danger signal driving dendritic cell maturation. **Scand J Immunol**, v. 66, n. 2-3, p. 128-36, Aug-Sep 2007.

SCHMITZ, V. et al. C5a and bradykinin receptor cross-talk regulates innate and adaptive immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 193, n. 7, p. 3613-23, Oct 1 2014.

SECO-HIDALGO, V.; DE PABLOS, L. M.; OSUNA, A. Transcriptional and phenotypical heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* cell populations. **Open Biol**, v. 5, n. 12, p. 150190, Dec 2015.

SEYA, T.; HOLERS, V. M.; ATKINSON, J. P. Purification and functional analysis of the polymorphic variants of the C3b/C4b receptor (CR1) and comparison with H, C4b-binding protein (C4bp), and decay accelerating factor (DAF). **J Immunol**, v. 135, n. 4, p. 2661-7, Oct 1985.

SILVA, G. K. et al. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1beta response and host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 191, n. 6, p. 3373-83, Sep 15 2013.

SILVA, G. K. et al. A parent-of-origin effect determines the susceptibility of a non-informative F1 population to *Trypanosoma cruzi* infection in vivo. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56347, 2013.

SILVA, G. K. et al. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 184, n. 3, p. 1148-52, Feb 1 2010.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clin & Biol**, v. 20, p. 191-208, 1953.

STAHL, P. et al. *Trypanosoma cruzi* evades the protective role of interferon-gamma signaling in parasite-infected cells. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110512, 2014.

STRAINIC, M. G. et al. Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells. **Immunity**, v. 28, n. 3, p. 425-35, Mar 2008.

TAMBOURGI, D. V. et al. Detection of Trypanosoma-decay accelerating factor antibodies in mice and humans infected with Trypanosoma cruzi. **Am J Trop Med Hyg**, v. 52, n. 6, p. 516-20, Jun 1995.

TARLETON, R. L. Immune system recognition of Trypanosoma cruzi. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 4, p. 430-4, Aug 2007.

_____. Chagas Disease: A Solvable Problem, Ignored. **Trends Mol Med**, v. 22, n. 10, p. 835-838, Oct 2016.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 3, p. 179-90, Mar 2007.

UMEKITA, L. F.; MOTA, I. In-vitro lysis of sensitized Trypanosoma cruzi by platelets: role of C3b receptors. **Parasite Immunol**, v. 11, n. 5, p. 561-6, Sep 1989.

_____. How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with T. cruzi? **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 3, p. 253-8, Mar 2000.

UMEKITA, L. F.; RAMOS, D. P.; MOTA, I. Clearance-inducing antibodies are responsible for protection against the acute phase of Trypanosoma cruzi infection in mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, n. 10, p. 1191-7, Oct 1997.

UMEKITA, L. F.; TAKEHARA, H. A.; MOTA, I. Role of the antibody Fc in the immune clearance of Trypanosoma cruzi. **Immunol Lett**, v. 17, n. 1, p. 85-9, Jan 1988.

VENTURINI, G. et al. Nitric oxide inhibits cruzipain, the major papain-like cysteine proteinase from Trypanosoma cruzi. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 270, n. 2, p. 437-41, Apr 13 2000.

VERSCHOOR, A. et al. Old dogs-new tricks: immunoregulatory properties of C3 and C5 cleavage fragments. **Immunol Rev**, v. 274, n. 1, p. 112-126, Nov 2016.

WEAVER, D. J., JR. et al. C5a receptor-deficient dendritic cells promote induction of Treg and Th17 cells. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 3, p. 710-21, Mar 2010.

WETSEL, R. A.; FLEISCHER, D. T.; HAVILAND, D. L. Deficiency of the murine fifth complement component (C5). A 2-base pair gene deletion in a 5'-exon. **J Biol Chem**, v. 265, n. 5, p. 2435-40, Feb 15 1990.

WHO. Chagas Disease (American trypanosomiasis). **Fact Sheet**, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>, 2016. Acesso em: 24/10/2016.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-4, Nov 2009.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 2, p. 240-53, Mar 2012.