



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

VERA LUCIA LIMA DE ALMEIDA

**Papel de citocinas e da leptina na imunopatologia da fase aguda na
infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos
nocautes para IL-4 e IFN- γ**

Goiânia, 2017

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

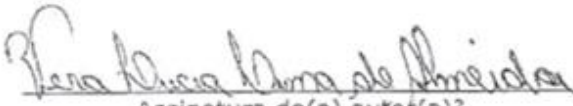
Nome completo do autor: Vera Lucia Lima de Almeida

Título do trabalho: Papel de citocinas e da leptina na imunopatologia da fase aguda na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos nocautes para IL-4 e IFN- γ

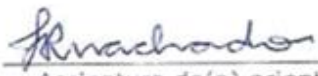
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

**Papel de citocinas e da leptina na imunopatologia da fase aguda na
infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos
nocautes para IL-4 e IFN- γ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública.
Área de concentração: Patologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana Reis Machado
Coorientadores: Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior e
Prof.^a Dr.^a Mara Rúbia Nunes Celes

Goiânia, 2017

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

Almeida , Vera Lucia Lima De

Papel de citocinas e da leptina na imunopatologia da fase aguda na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos nocautes para IL-4 e IFN- γ [manuscrito] / Vera Lucia Lima De Almeida . - 2017.

66 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Juliana Reis Machado; co-orientador Dr. Ruy de Souza Lino Júnior; co-orientador Dra. Mara Rúbia Nunes Celes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Resposta imune celular. 3. Coração,. 4. Adipocitocinas . 5. Nocaute. I. Machado, Juliana Reis, orient. II. Título.

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE VERA LÚCIA LIMA DE ALMEIDA – Aos sete dias do mês de abril do ano de 2017 (07/04/2017), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. JULIANA REIS MACHADO E SILVA, ANA MARIA DE CASTRO e FLÁVIA APARECIDA DE OLIVEIRA, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“AVALIAÇÃO DE CITOCINAS E LEPTINA NA FASE AGUDA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO TRYPANOSOMA CRUZI EM CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA IL-4 E IFN- γ ”**, em nível de **MESTRADO**, área de concentração em **PATOLOGIA**, de autoria de **VERA LÚCIA LIMA DE ALMEIDA**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. **JULIANA REIS MACHADO E SILVA**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1304/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Juliana Reis Machado e Silva

Profa. Dra. Ana Maria de Castro

Profa. Dra. Flávia Aparecida de Oliveira

Aprovada / Reprovada

Aprovada
Aprovada
Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Habilitada, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **PATOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 h 35 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Papel de citocinas e da leptina na imunopatologia da fase aguda na infecção experimental pelo Trypanosoma cruzi em camundongos nocautes para IL-4 e IFN- γ .

Profa. Dra. Juliana Reis Machado e Silva (IPTSP/UFG)

Profa. Dra. Ana Maria de Castro (IPTSP/UFG)

Profa. Dra. Flávia Aparecida de Oliveira (IPTSP/UFG)

Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura

Juliana Reis Machado e Silva
Ana Maria de Castro
Kariny Vieira Soares e Silva

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da
Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno(a): Vera Lucia Lima de Almeida

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Juliana Reis Machado

Membros:

1. Prof.^a Dr.^a Juliana Reis Machado

2. Prof.^a Dr.^a Flávia A. de Oliveira

3. Prof.^a Dr.^a Ana Maria de Castro

Data: 07/04/2017

Sonhos são realizações de desejos ocultos e são ferramentas que buscam equilíbrio pela compensação. É o meio de comunicação do inconsciente com o consciente.

Carl Jung

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido a benção de chegar até aqui, só ele sabe o quão difícil foi à caminhada desde que me propus a vir pra Goiânia estudar.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a. Juliana Reis Machado por ter acreditado e sonhado esse sonho junto comigo, pela confiança em mim depositada e por toda paciência, dedicação, ensinamentos, conselhos e orientações. Sempre me incentivando e motivando a fazer o melhor que eu pudesse. Um grande ser humano que tornou - se um exemplo de vida para mim.

Aos meus coorientadores Dr.^o Ruy de Souza Lino Junior e Dr.^a Mara Rúbia Nunes Celes, pela amizade, apoio, confiança e dedicação,

Ao Dr.^o Marcos Vinícius Silva; Dr.^a Vânia Beatriz Lopes e a Ms.^a Pollyana Guimarães de Oliveira, por todo apoio e contribuição científica para a realização deste trabalho, que foi de extrema importância em todas as etapas.

A minha amada família, que sempre foi meu grande ponto de apoio, mesmo não estando aqui presente por todo o tempo, sempre acreditaram em mim e me fizeram acreditar que com persistência e fé eu irar conseguir, obrigada a minha mãe Eloina Silva por todas as orações, ao meu pai Jessé Bispo pelo seu amor incondicional, ao meu irmão Jefferson Lima nunca se tornou ausente mesmo estando distante, sempre preocupado em saber como eu estava e me ajudando sempre que eu precisasse, as minhas irmãs Vanessa Lima que me impulsionava a sempre seguir em frente e a Jessiele Lima que foi um anjo em minha vida desde que veio morar comigo sempre me ajudou muito.

Ao Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira, por ter aberto as portas do seu laboratório que tornou possível a realização de algumas técnicas requerida no desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os meus amigos do laboratório de Patologia Geral do IPTSP/UFG. Aos alunos da iniciação científica envolvidos nesse tema, Amanda, Flávia, Wendyson, Nathália, Maiara e Letícia, por estarem sempre me ajudando no desenvolvimento do projeto.

A todos os professores da Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública do IPTSP/UFG, pela enorme contribuição para o meu conhecimento científico. Ao Programa de Pós-Graduação e Medicina Tropical e Saúde Pública pela contribuição científica e metodológica.

Ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, que viabilizou a realização deste projeto como também o crescimento profissional de cada aluno.

SUMÁRIO

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS.....	16
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	16
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	16
INTRODUÇÃO/REVISÃO DA LITERATURA.....	18
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
1.2 Utilização do modelo experimental e da cepa Colombiana	19
1.3 Patogênese.....	19
1.4 Resposta imunológica	20
1.5 Adipocitocinas: Leptina	22
JUSTIFICATIVA	16
OBJETIVOS	31
Objetivo Geral	19
Objetivos Específicos.....	19
MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
1.1 Animais	19
1.2 Obtenção do <i>Trypanosoma cruzi</i> para inóculo em camundongos	19
1.3 Processamento de lâminas.....	19
1.4 Quantificação dos ninhos de amastigotas	19
1.5 Quantificação do infiltrado inflamatório.....	19
1.6 Quantificação da fibrose	19
1.7 Homogenato cardíaco.....	19
1.8 ELISA do homogenato cardíaco e do plasma	19
1.9 Análises estatísticas.....	19
RESULTADOS	36
1.1 Ninhos de amastigotas	19
1.2 Infiltrado inflamatório	19
1.3 Fibrose.....	19
1.4 Produção de citocinas <i>in situ</i>	19
1.5 Produção sérica de leptina.....	19
1.6 Produção sérica de TNF- α	19
1.7 Produção sérica de IL-10	19
DISCUSSÃO	35
CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXO	61

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Figura 1 – Distribuição dos casos de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> ,.....	2
Figura 2 – Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	4
Figura 3 – Alterações cardíacas microscópicas resultantes da infecção crônica pela cepa Colombiana.....	9
Figura 4 – Resposta imunológica.....	15
Tabela 1 – Distribuição de casuística conforme grupo de animais.....	22
Figura 5 – Ninhos de <i>T. cruzi</i> no tecido cardíaco.....	28
Figura 6 – Percentual (%) de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco	29
Figura 7 – Percentual (%) de fibrose no coração.....	30
Figura 8 – Expressão de TNF- α (pg/g) no coração de camundongos infectados e não infectados pela cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
Figura 9 – Expressão de IL-12p70 (pg/g) no coração de camundongos infectados e não infectados pela cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
Figura 10 – Expressão de IFN- γ (pg/g) no coração de camundongos infectados e não infectados pela cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
Figura 11 – Expressão de IL-17 (pg/g) no coração de camundongos infectados e não infectados com a cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
Figura 12 – Expressão de IL-10 em (pg/g) no coração de camundongos infectados e não infectados pela cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
Figura 13 – Níveis séricos de leptina (ng/mL) no soro de camundongos infectados e não infectados com a cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
Figura 14 – Níveis séricos de TNF- α (ng/mL) no soro de camundongos infectados e não infectados com a cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
Figura 15 – Níveis séricos de IL-10 (ng/mL) no soro de camundongos infectados e não infectados com a cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
Prancha 1 – Cortes histológicos de coração de camundongos infectados com 100 formas da cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i>	42

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

KO - Nocaute para o gene
μL - Microlitro
μm - Micrômetro
CCC - Cardiopatia chagásica crônica
CEUA - Comissão de ética de uso de animais
CG - Grupo controle
Cm - Centímetros
CTGF - Fator de crescimento do tecido conjuntivo
DCs - Células dendríticas.
ECG - Eletrocardiograma
ELISA - Ensaio Imunoenzimático.
EUA - Estados Unidos da América
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
HE - Hematoxilina e eosina
HLA - Antígeno leucocitário humano
HVE - Hipertrofia ventricular esquerda
IF - Forma indeterminada
IFN-γ - Interferon gama
Ig - Imunoglobulina
IL - Interleucina
IPTSP - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
LVD - Disfunção sistólica ventricular esquerda
MEC - Matriz extracelular
mg - Miligrama
mL - Mililitro
mM - Micromolar
NO - Óxido nítrico
OMS - Organização Mundial de Saúde
PAMP - Padrões moleculares associados ao patógeno.
PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfatos
PMNs - Polimorfonucleares
RPMI - Meio de cultura desenvolvido por Roswell Park Memorial
SBF - Soro Fetal Bovino
T. cruzi - *Trypanosoma cruzi*
TGFβ - Fator de transformação do crescimento beta.
Th - Linfócitos T auxiliar
Th1 - Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2 - Linfócito T auxiliar do tipo 2
TLR - receptores tipo Toll
TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa
Tregs - Células T reguladoras
UFG - Universidade Federal de Goiás
VSMCs - Células do músculo liso vascular
WT – Selvagem

RESUMO

A doença de Chagas é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Aproximadamente 30% dos indivíduos infectados desenvolvem a manifestação cardíaca. Dentre os fatores envolvidos nesta evolução destaca-se o papel da inflamação. Evidências apontam uma importante relação das adipocitocinas com a resposta imune celular e inflamação. O presente estudo objetivou avaliar o papel de citocinas e da leptina na imunopatologia da fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi*. Para isso foram utilizados camundongos C57Bl/6 WT, C57Bl/6 KO IFN- γ , Balb-c WT e Balb-c KO IL-4 infectados com 100 formas tripomastigotas de cepa Colombiana de *T. cruzi* e controles não infectados. Foi analisado nos corações a presença ninhos de *T. cruzi*, infiltrado inflamatório, fibrose, produção de citocinas *in situ* e níveis séricos de leptina, TNF- α e IL-10. Foi observado maior parasitismo tissular nos animais C57Bl/6 KO IFN- γ , mas sem diferença na intensidade do infiltrado inflamatório e percentual de fibrose. Em relação as citocinas os camundongos C57Bl/6 KO IFN- γ infectados apresentaram aumento de TNF- α *in situ*, assim como os Balb-c KO IL-4. Apesar de maior expressão *in situ*, sistemicamente os animais Balb-c KO IL-4 não mostram ser bons produtores de TNF- α e IL-10 assim como os C57Bl/6 KO IFN- γ , entretanto esses últimos mostraram ser bons produtores de leptina sérica, assim como os Balb-c. Dessa forma, nossos resultados apontam que na ausência de IFN- γ os camundongos infectados não conseguem controlar o parasitismo tissular. Entretanto apresentam aumento *in situ* de TNF- α e leptina sérica como mecanismo compensatório da deficiência de resposta Th1, representado pela ausência de IFN- γ .

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, resposta imune celular, coração, adipocitocinas, nocaute.

ABSTRACT

Chagas disease is a parasitic disease caused by the Protozoan *Trypanosoma cruzi*. Approximately 30% of infected individuals develop cardiac manifestations. Among the factors involved in this evolution highlights the role of inflammation. Evidence points to an important relationship of adipokines with the cellular immune response and inflammation. The present study is objective is to evaluate the role of cytokines and leptin on immunopathology of acute phase of experimental infection by *T. cruzi*. For this we used C57Bl/6 WT mice, C57Bl/6 WT KO IFN- γ , Balb-c WT and Balb-c KO IL-4 100 infected with of Colombian strain forms of *T. cruzi* and non-infected controls was analyzed in the hearts the presence of *T. cruzi*, fibrosis, inflammatory infiltrate, production of cytokines *in situ* and serum levels of leptin, TNF- α and IL-10. Noted greater tissue parasitism in C57Bl/6 animals KO IFN- γ , but no difference in the intensity of the inflammatory infiltrate and percentage of fibrosis. Regarding cytokines C57Bl/6 mice IFN- γ KO infected showed increased TNF- α *in situ*, as well as the Balb-c KO IL-4. Despite greater expression *in situ*, systemically animals Balb-c KO IL-4 have shown to be good producers of TNF- α and IL-10 as well as the C57Bl/6 KO IFN- γ . However, these last have shown to be good producers of serum leptin, as well as the Balb-c. Thus, our results indicate that in the absence of IFN- γ mice infected can' not control the tissue parasitism. However, feature increased *in situ* of TNF- α and serum leptin as a compensatory mechanism of the Th1 response deficiency.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, cellular immune response, heart, adipocytokines, knockouts.

INTRODUÇÃO/REVISÃO DA LITERATURA

A doença de Chagas ou tripanossomíase Americana é uma doença tropical negligenciada, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (CHAGAS, 1909; WHO, 2016).

Estima-se que em torno de 6 a 7 milhões de pessoas em todo mundo estão infectados pelo *T. cruzi*, sendo que a maioria destas vivem na América Latina. A doença de Chagas é encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países da América Latina (WHO, 2016). Já foram confirmados casos de indivíduos infectados em países não endêmicos na Europa, na região do Pacífico Ocidental (principalmente na Austrália e Japão), Canadá e Estados Unidos, o que é resultante da migração de países endêmicos para outras partes do mundo (SCHMUNIS *et al.*, 2010). Devido a esse efeito migratório também houve o aumento do risco da transmissão através das transfusões de sangue ou órgãos transplantados em países onde não é obrigatória a triagem do sangue ou do órgão do doador e com isso a falta de conhecimento prévio a respeito da doença dificulta o diagnóstico rápido e preciso, retardando assim o início do tratamento (WHO, 2010).

Com o passar dos anos a taxa de mortalidade da doença de Chagas diminuiu, de 45000 para aproximadamente 11000 entre os anos de 1990 e 2009 (WHO, 2010). Em 2005 foi realizado um estudo, onde se calculou a prevalência da infecção pelo *T. cruzi*, em pessoas nascidas na América Latina que vivem nos EUA, com isso, estimou-se mais 300000 pessoas infectadas com o *T. cruzi* que vivem nos EUA e em torno de 45000 tinha cardiopatia chagásica, e que 63 – 315 pessoas infectadas, foram resultantes de infecção congênita (BERN *et al.*, 2009). Na Europa estima-se que o número de indivíduos infectados exceda 80000 (WHO, 2010) (Figura 1).

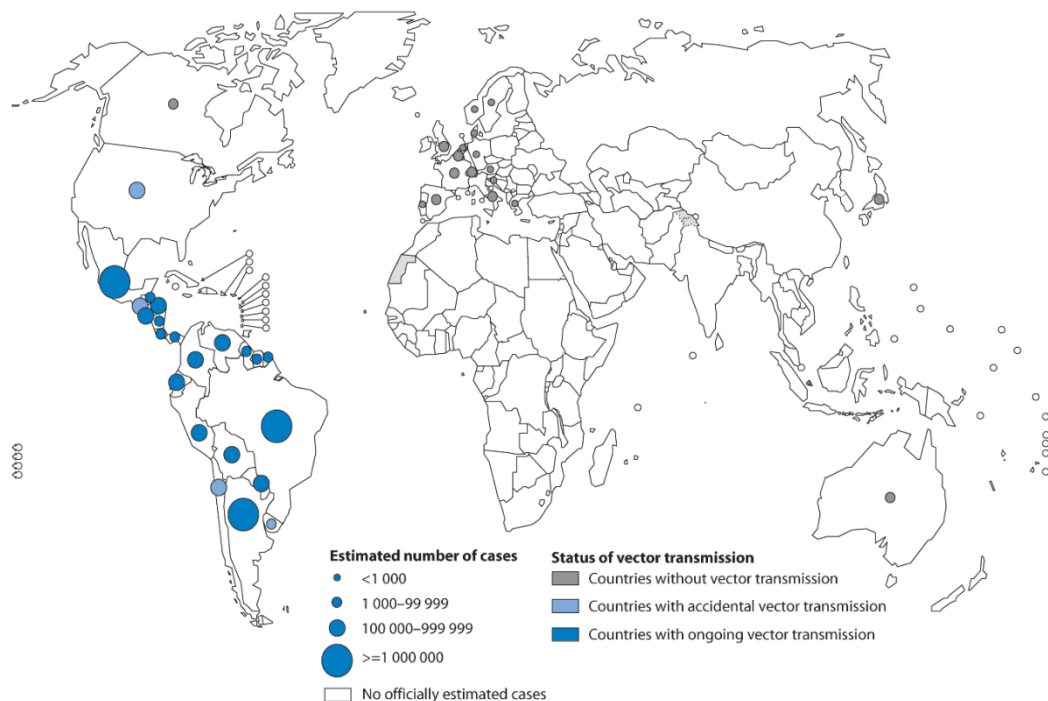


Figura 1 - Distribuição dos casos de infecção por *Trypanosoma cruzi*, com base em estimativas oficiais e estatuto de transmissão de vetores, em todo o mundo, 2006 - 2009. Fonte: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_chagas_2009.png>. Acesso em dezembro, 2016.

1.1 *Trypanosoma cruzi*

O agente etiológico da doença de Chagas é o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), trata-se de um protozoário flagelado com ciclo de vida heteroxênico, com fase de replicação intracelular no hospedeiro vertebrado (homem e mamíferos) e extracelular no inseto vetor (triatomíneos) (CHAGAS, 1909).

A transmissão vetorial é o mecanismo de transmissão do *T. cruzi* de maior importância epidemiológica (CHAGAS, 1909; LANA & TAFURI, 2004). São conhecidas mais de 120 espécies de vetores da tripanossomíase Americana, que possuem hábito estritamente hematófago. Os principais fatores de sucesso evolutivo desses vetores são: hábito noturno, elevada habilidade reprodutora, vida longa e grande capacidade de resistência ao jejum. As espécies que se relacionam com os seres humanos, especialmente em ambiente intradomiciliar, são as mais importantes do ponto de vista epidemiológico para a doença de Chagas (DIAS & COURA, 1997), sendo o *Tryatoma infestans*, o inseto vetor mais conhecido. Este é conhecido popularmente como barbeiro (CHAGAS, 1909).

Durante o repasto sanguíneo o vetor, *Tryatoma infestans*, se infecta com o *T. cruzi* sofre uma série de modificações ao longo do tubo digestivo: os tripomastigota

transformam-se em esferomastigotas e epimastigotas; no intestino médio, há a multiplicação dos epimastigotas; no reto, os epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, que são eliminados nas dejeções dos triatomíneos (DIAS & COURA, 1997). Após se alimentar com o sangue do hospedeiro vertebrado o triatomíneo defeca e urina no local. O indivíduo ao coçar o local permite com que os tripomastigotas metacíclicos penetram através da pele, caindo na corrente sanguínea, e infecte as células teciduais. Após infectar a célula o parasita se diferencia em amastigota, que é a forma intracelular capaz de multiplicar e pós o término do ciclo transformam em tripomastigota para infectar outras células e/ou reiniciar o ciclo (CHAGAS, 1909) (Figura 2).

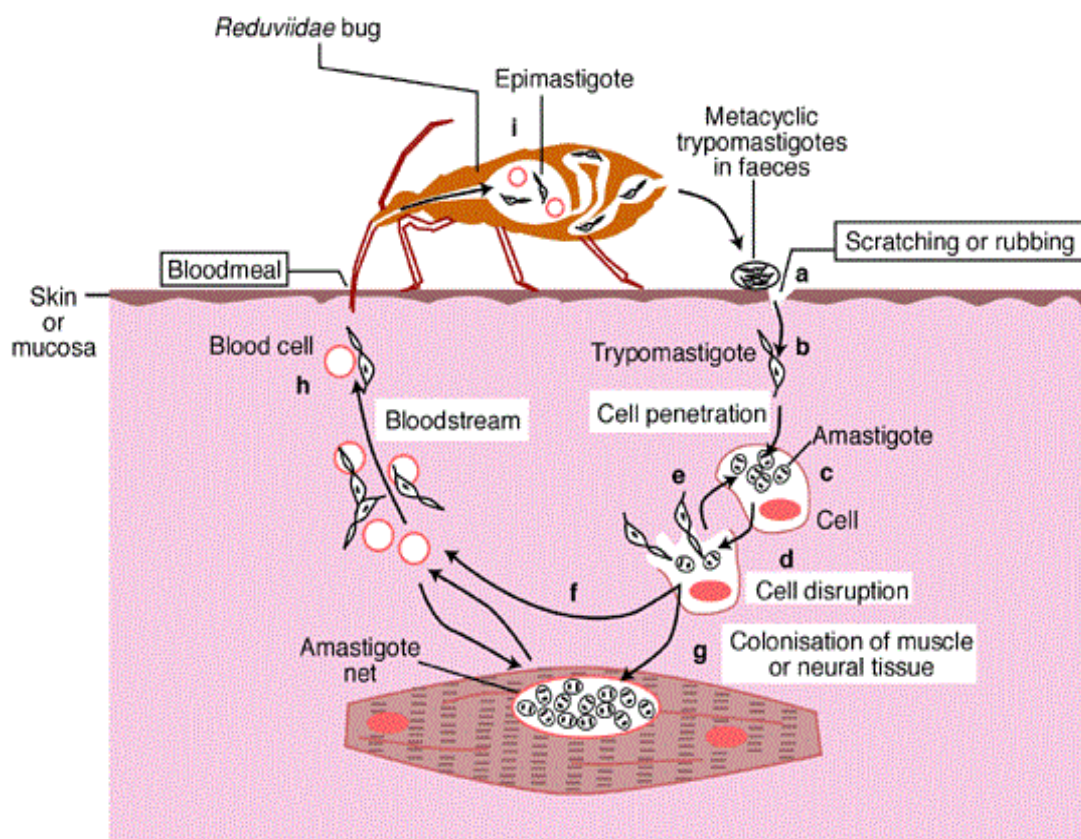


Figura 2 - Representação esquemática do ciclo de vida do protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Fonte: MACEDO *et al.*, 2002.

O *T. cruzi* pertence ao reino Protista, sub-reino Protozoa e filo Sarcomastigophora (SOUZA *et al.*, 2000). Estudos sobre sua genética forneceram evidências que este parasita é um organismo diploide com reprodução assexuada e com estrutura populacional clonal (TIBAYRENC & AYLA, 1988; TIBAYRENC, 1995). Mais tarde a análise dos genes confirmou a existência de duas linhagens

filogenéticas principais (ZINGALES *et al.*, 1999). As linhagens foram denominadas de “grupos” *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (ANONYMOUS, 1999). A partir da análise de microsatélites e DNA mitocondrial, foi proposto um terceiro grupo, denominado *T. cruzi* III (FREITAS *et al.*, 2006). Para melhorar o entendimento de questões biológicas básicas e de patogenicidade dos grupos, houve a padronização dos grupos de *T. cruzi*, dividido em seis grupos (*T. cruzi* I-VI), cada grupo é denominado DTU (“discrete typing unit”), o DTU é definido como um conjunto de isolados geneticamente semelhante e que podem ser identificados por marcadores moleculares ou imunológicos comuns. (ZINGALES *et al.*, 2009).

1.2 Utilização do modelo experimental e da cepa Colombiana

Estudos em animais tem sido de grande importância para definição de mecanismos moleculares associados com a resposta imune frente ao *T. cruzi* (TALVANI *et al.*, 2011). No modelo experimental murino, os camundongos sobrevivem à infecção em longo prazo, por certas quantidades de *T. cruzi* e desenvolvem lesões do miocárdio (ANDRADE *et al.*, 1968).

As manifestações resultantes da doença de Chagas em modelo murino experimental se assemelham as observadas em infecções humanas, e em ambas há influência do background genético, desencadeando uma série de reações que evolui de uma fase aguda sintomática para uma fase crônica. Nesses modelos a maioria dos tipos celulares são infectados, visto que são de maior importância os da musculatura cardíaca e de musculatura esquelética (BRENER, 1973; BURLEIGH *et al.*, 1995)

Algumas variáveis interferem no grau de patogenicidade da doença de Chagas, como a cepa infectante e a linhagem do camundongo (ANDRADE *et al.*, 1985). Camundongos da linhagem C57Bl/6 são descritos como resistentes, enquanto os camundongos BALB/c são ditos como susceptíveis a infecção pelo *T. cruzi* (ANDRADE *et al.*, 1985; ARAUJO-JORGE & CASTRO, 2000). Nos BALB/c observa-se uma elevada parasitemia e a grande maioria sucumbem precocemente a infecção aguda. Entretanto, os C57Bl/6 são os considerados resistentes, pois desenvolvem baixa parasitemia e baixo índice de mortalidade, dependendo do inoculo (ARAUJO-JORGE & CASTRO, 2000)

Frente a infecção pelo *T. cruzi*, o processo de ativação de macrófagos por citocinas parece ser fundamental para controlar a multiplicação parasitária. Dessa forma, alterações na expressão de genes que estão relacionados às citocinas, podem

modificar a resposta imunológica do hospedeiro e consequentemente o desfecho da doença. Com isso vem crescendo de forma exponencial o número de estudos que utilizam animais nocautes para mediadores envolvidos na patogênese da doença. (ANDRADE *et al.*, 2002; BORGES *et al.*, 2009).

Camundongos nocautes para IFN- γ são mais susceptíveis a infecção por patógenos como o *T. cruzi*, porque são incapazes de controlar o crescimento do parasita, enquanto que camundongos com o mesmo genótipo e que expressam esse fator, sobrevivem à infecção (HOLSCHER *et al.*, 1997; NOLAN *et al.*, 2000; MARTINS *et al.*, 2004; ALIBERT *et al.*, 2000; MICHAILOWSKY *et al.*, 2001.)

Animais nocautes para IL-4 tendem a ter uma melhor resposta a infecção por parasitas intracelulares, sendo que os camundongos nocautes para IL-4 aumentam resposta imune tipo Th1 quando infectados com o *T. cruzi*, esses animais tem uma reduzida parasitemia e mortalidade e uma exacerbada reação inflamatória em seus corações (HOLSCHER *et al.*, 1997; SOARES *et al.*, 2001; SAEFTTEL *et al.*, 2004)

No que diz respeito às cepas de *T. cruzi*, centenas já foram descritas caracterizada e utilizada em trabalhos experimentais. Já tem descritos os caracteres biológicos e isoenzimáticos de 138 cepas do *T. cruzi*, de diferentes áreas geográficas, sendo 120 do Brasil e 18 de outros países da América do Sul e Central (ANDRADE *et al.*, 1997). Algumas dessas cepas são: Colombiana; Sylvio-10; Dm-28c; Tulahen; Y; Berenice; Esmeraldo; Peru; 12-SF; Can-III; etc (ANONYMOUS, 1999)

A cepa Colombiana vem sendo utilizada em vários trabalhos com a finalidade de avaliar a função cardíaca, devido seu miotropismo evidente (FEDERIC *et al.*, 1964; ANDRADE *et al.*, 1970; MILES *et al.*, 1980, ANDRADE *et al.* 1983, ANDRADE & MAGALHÃES, 1997; BORGES *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2014).

Federic *et al.*, 1964 foi o pioneiro nos estudos de investigação experimental com a cepa Colombiana, seus trabalhos descreveram uma progressiva miocardite na fase crônica junto com uma progressão lenta da parasitemia, que tem seu pico entre 20° a 30° dias pós-infecção (FEDERIC *et al.*, 1964; ANDRADE *et al.*, 1970).

Em humanos a cepa Colombiana foi descrita pela primeira vez em um paciente na Colômbia. Nessa época ela foi classificada como Bioderma III de acordo com suas características biológicas e alguns aspectos histopatológicos (ANDRADE *et al.*, 1974). Posteriormente foi realizada uma classificação de acordo com o perfil isoenzimático, no qual a cepa Colombiana foi descrita como Zimodema Z1 (MILES

et al., 1980, ANDRADE *et al.* 1983, ANDRADE & MAGALHÃES., 1997). Em 1999, foi realizado um consenso para padronizar os grupos a qual as cepas de *T. cruzi* pertencem, como a cepa Colombiana era Zimodema Z1 ela foi classificada como *T. cruzi* I (ANONYMOUS, 1999), que no Brasil está relacionada com o ciclo silvestre (DURANTI *et al.*, 2012), com predomínio na região norte e em outros 18 países da América Central (ANDRADE *et al.*, 1997).

Como característica desta cepa tem-se, lesões miocárdicas proeminentes com intenso processo inflamatório, evolução na parasitemia, com pico entre 21 a 25 dias pós infecção, nítido miotropismo, com acometimento da musculatura esquelética, resultando em extensas lesões nas fibras musculares esqueléticas, alterações eletrocardiográficas e resistência a quimioterápicos como o benzonidazol e o nifortimux (ANDRADE *et al.*, 1985; ANDRADE *et al.*, 1997; ANDRADE *et al.*, 2000).

Estudos do nosso grupo demonstraram que a resposta inflamatória resultante da infecção pela cepa Colombiana é bem mais acentuada quando comparada com outras cepas, como por exemplo a cepa Y, nota-se também um número de ninhos muito mais acentuado (BORGES *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2014)

1.3 Patogênese

A doença de Chagas possui um curso clínico bifásico (fase aguda e crônica), podendo se manifestar sob várias formas; na fase aguda as manifestações podem ser sintomáticas ou assintomáticas (PRATA, 2001). A parasitemia na fase aguda é caracteristicamente elevada, podendo ser detectada até a oitava semana de infecção. A apresentação sintomática ocorre principalmente em crianças na primeira década de vida (DIAS & COURA, 1997). Em pacientes sintomáticos, as manifestações incluem sinal de porta de entrada (chagoma de inoculação), febre, adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia e miocardite. Cecílio Felix Romaña Berón de Astrada descreveu o sinal de porta de entrada ocular que ficou conhecido como: O Sinal de Romanã (edema periorbital, unilateral, indolor) (ROMANÃ, 1935).

Na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) desencadeia a imunidade inata em múltiplos tipos de células (MICHAILOWSKY *et al.*, 2001). O comprometimento cardíaco não é incomum na

fase aguda sintomática, apresentando manifestações precoces (LOPES *et al.*, 2006). Há presença acentuada do parasita *T. cruzi* que resulta em uma marcante miocardite, com um intenso infiltrado inflamatório, com predominância das células TCD8⁺ e CD4⁺. Nota-se também macrófagos ativados e lesão direta nos miócitos, às vezes com reposição por fibras de colágenos (LANNES-VIEIRA, 2003).

Em geral a doença de Chagas torna-se clinicamente evidente, na fase crônica, 10 a 30 anos depois da infecção aguda, com o acometimento de órgãos específicos, particularmente o coração, esôfago e o cólon, qual caracteriza distintas formas crônicas da doença: cardíaca, digestiva ou ambas (cardio-digestiva) (COURA *et al.*, 2007). A prevalência do megaesôfago e do megacólon (alargamento anormal e disfunção do esôfago e do cólon, respectivamente) varia entre os países de acordo com a cepa predominante.

No Brasil, 5 a 8% dos pacientes com doença de Chagas desenvolvem esofagopatia, 4 a 6% desenvolvem colonpatia crônica e 30% cardiopatia chagásica (ROCHA *et al.*, 2003).

A cardiopatia chagásica crônica (CCC) é a mais importante manifestação clínica resultante da doença de Chagas, constitui como elemento determinante principal de incapacidade laborativa e do prognóstico dos pacientes acometidos por essa enfermidade (BESTETTI & MUCCILLO, 1997; COURA *et al.*, 1983). As manifestações da CCC são três síndromes básicas que podem coexistir em um mesmo paciente: falha cardíaca, arritmia cardíaca, e tromboembolismo (CUNHA-NETO *et al.*, 1998).

A CCC é caracterizada por miocardite com um infiltrado inflamatório mononuclear, com um acentuado dano nas fibras cardíacas, fibrose proeminente, e escassez do parasita *T. cruzi* (CUNHA-NETO *et al.*, 2009). O infiltrado inflamatório nas lesões cardíacas na CCC é composto principalmente por linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e macrófagos (HIGUCHI *et al.*, 1993; FONSECA *et al.*, 2007). Algumas causas de morte súbita por cardiopatia chagásica são bem conhecidas como: parada cardíaca súbita e insuficiência cardíaca progressiva, principalmente em indivíduos com função sistólica ventricular esquerda deprimida (COURA, 2007). Acredita-se que a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) seja uma das principais causas de falha cardíaca resultando em hipertensão e aumento da matrix extracelular e estruturas de colágenos (GERDTS, 2008) (Figura 3).

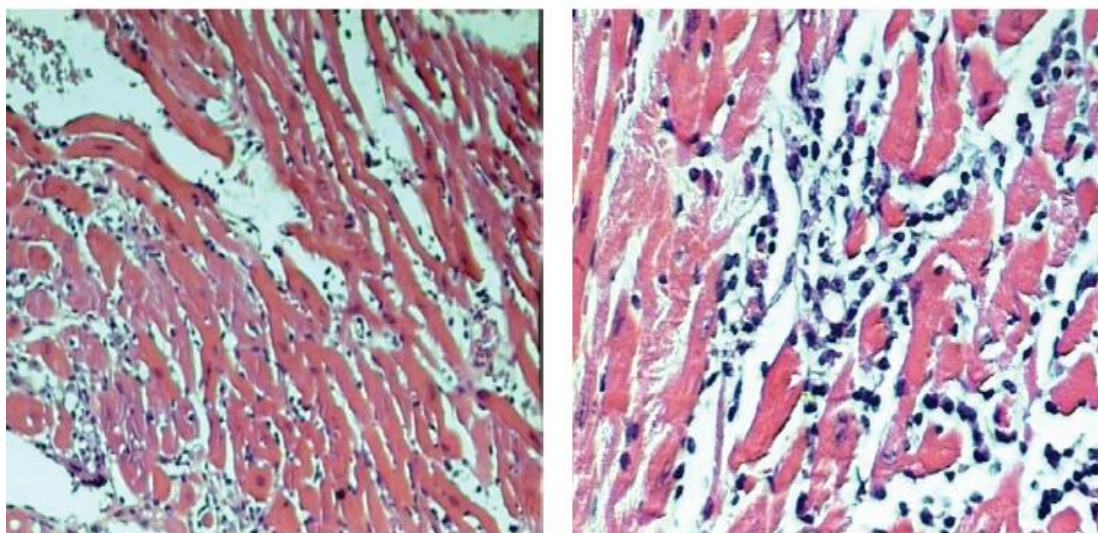


Figura 3 - Alterações cardíacas resultantes da infecção e reinfecção com a cepa Colombiana de *T. cruzi*.
Fonte: MACHADO *et al.*, 2014.

Ainda não foi inteiramente esclarecido o mecanismo responsável pelo desenvolvimento da cardiopatia, mas já foi descrito que as lesões produzidas na fase aguda da infecção determinam o desenvolvimento das lesões desenvolvidas na fase crônica da cardiopatia chagásica (HERNAO-MATINEZ, 2014).

O desenvolvimento ou não das diversas manifestações clínicas decorrem, principalmente de mecanismos imunes do hospedeiro, da persistência do parasitismo, e dos genótipos de *T. cruzi* envolvidos (HIGUCHI *et al.*, 2003; LAZDINS *et al.*, 2003; MARIN-NETO *et al.*, 2007).

Entre os mecanismos propostos para explicar a fisiopatogênese da doença de Chagas, a presença do *T. cruzi* parece ter um papel fundamental na resposta imune, contribuindo para imunidade específica contra o parasito nas alterações cardiológicas, por destruição e rearranjo de cardiomiócitos, lesando a microvasculatura e produzindo alterações da contratilidade (KUMAR & TARLETON, 2001).

A escassez de parasitos e à intensidade e extensão das lesões, assim como o prolongado período de latência, têm levado diversos autores a avaliarem o envolvimento de fatores autoimunes na patogênese da lesão chagásica, relacionados à existência de reação cruzada entre os componentes autólogos e antígenos do *T. cruzi*. Esta resposta contra os antígenos presentes no tecido cardíaco favoreceria o desenvolvimento das formas mais graves da cardiopatia chagásica. Já foram descritos anticorpos contra receptores β 2-adrenérgicos e colinérgicos na doença de Chagas e a

lesão celular seria induzida por autoimunidade mediada por mecanismos de mimetismo molecular e pela disseminação ou intercâmbio de epítomos (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 1998; CUNHA-NETO *et al.*, 1998; CUNHA-NETO & KALIL, 2001; KIERSZENBAUM, 2003; CUNHA-NETO *et al.*, 2005; KIERSZENBAUM, 2005; CUNHA-NETO & BILATE, 2006; CUNHA-NETO & TEIXEIRA, 2006; SAVINO *et al.*, 2007)

É consensual que o sistema imune é importante na redução da carga parasitária. Todavia, uma resposta inflamatória sustentada com lesão tecidual degenerativa e reparadora com fibrose no coração, esôfago e colón pode contribuir para o aparecimento das manifestações crônicas observadas nos pacientes chagásicos (TEIXEIRA *et al.*, 2002).

1.4 Resposta imunológica

Diversos mecanismos das respostas imunológica inata e adquirida, humorais e celulares, estão presentes na infecção pelo *T. cruzi*. A resposta imunológica do hospedeiro vertebrado a infecção pelo *T. cruzi* inicia-se logo após a entrada do parasita no organismo, a fim de reduzir o número de parasitas (LANA & TAFURI, 2004).

A imunidade inata atua através da síntese de citocinas e ativação de células natural killer (NK), macrófagos e células dendríticas (COSTA *et al.*, 2006). As células NK produzem IFN- γ e direcionam um mecanismo microbicida frente ao *T. cruzi*, ao induzir a síntese de NO em macrófagos (MUNOZ-FERNANDEZ *et al.*, 1992; CARDILLO *et al.*, 1996). Assim como o IFN- γ , o TNF- α também é capaz de induzir a ativação de macrófagos (SILVA *et al.*, 1991), enquanto que, o TGF- β e a IL-10 inibem esta ativação (SILVA *et al.*, 1992).

As células Natural killer (NK) e os linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (T CD8⁺) eliminam células infectadas com patógenos através da secreção de grânulos citolíticos como as granzimas e as perforinas. Contudo, essas moléculas citotóxicas não conseguem destruir o parasita intracelular. (CHOWDHURY, 2008).

A fagocitose mediada por macrófagos é capaz de estimular a produção de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-12 e TNF- α que contribuem para produção de IFN- γ pelas células “natural killer” que, junto ao óxido nítrico, terão um papel importante no controle do crescimento parasitário do *T. cruzi*, estimulação de macrófagos, metabolitos tóxicos e de quimiocinas contra o parasito, que têm um papel

essencial no transporte de leucócitos. Recentes estudos demonstraram que durante a fase inicial da infecção pelo *T. cruzi*, os macrófagos respondem aos tripomastigotas por meio de estímulos gerados pelos receptores de reconhecimento padrão tipo 2 (TLR-2), que estimulam a produção de citocinas como IL-12 e TNF- α e facilitam a polarização da resposta TCD4⁺ e TCD8⁺ voltada para produção de IFN- γ , que é responsável pelo controle da infecção e imunopatogenia nos tecidos cardíacos.

Estudos avaliando a produção de IL-12 e IFN- γ pelas células do baço de camundongos, infectados experimentalmente com cepas de *T. cruzi*, afirmaram que o efeito central do IFN- γ *in vivo* seria a geração do óxido nítrico, que participa da destruição intracelular dos parasitas. Observaram que durante toda a fase aguda houve um aumento na produção IL-12 e IFN- γ pelas células esplênicas, devido ao aumento da atividade das células NK. Concluíram que a resposta global na fase aguda foi, predominantemente, do tipo Th1 nas diferentes cepas de camundongos e que os fatores que controlam essa resposta protetora são de importância primária para determinar a resistência à infecção ou o dano tissular (CARDONI *et al.*, 1999). Além disso, o perfil Th1 representado principalmente pelas citocinas inflamatórias IFN- γ e TNF- α , é caracterizado pela expressão do fator de transcrição T-box expressed in T cells (T-bet), ativam macrófagos, resultando em um padrão caracterizado pela produção elevada de agentes antimicrobicidas como o óxido nítrico (NO) e as espécies reativas do oxigênio (MANTOVANI *et al.*, 2004).

A subpopulação Th1 produz IFN- γ , que tem efeito na ativação de fagócitos, aumentando a sua atividade microbicida promovendo a eliminação de patógenos intracelulares (LUCKHEERAM *et al.*, 2012; OESTREICH & WEINMANN, 2012). As células Th1 secretam também IL-2 e TNF- α , que induz uma resposta imune mediada por células (BOOM *et al.*, 1988). A IL-12 e o IFN- γ são as citocinas responsáveis por iniciar as sinalizações de um perfil de resposta Th1 (YAMANE & PAUL, 2013). A IL-12 é uma citocina heterodimérica que tem vários efeitos sobre as células NK e T (TRINCHIERI, 1994). A IL-12 é composta pela combinação de duas cadeias, a p40 e a p35 (TRINCHIERI *et al.*, 2003). A sua forma ativa, composta pela cadeia p40 mais a p35, resultando na p70 (VIGNALI & KUCHROO, 2012). Ela é uma mediadora fundamental da resposta imunológica inata é importante no estímulo da produção de IFN- γ pelas células NK e linfócitos T (ROGGE *et al.*, 1997).

O IFN- γ é produzido principalmente por célula T, B e NK, possui uma atividade antiparasitária (MAEYER *et al.*, 1992). Em 1995, REIS sugeriu que esta

citocina estava relacionada com o controle da infecção, resultante da análise comparativa dos grupos com casos negativos ou com escassez de *T. cruzi*, nesses a presença de linfócitos IFN- γ estavam muito mais elevados. Já foi demonstrado que a célula T que infiltra no coração de pacientes com CCC produzem de forma predominante IFN- γ e TNF- α , e o tecido cardíaco mostra um aumento proporcional na expressão de moléculas de adesão (CUNHA-NETO *et al.*, 2010).

A resposta imune tipo Th2 é responsável pela produção de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, sendo a IL-4 é a citocina mais característica e necessária para diferenciação de T virgens em Th2 (GOSWAMI & KAPLAN, 2011) bem como do fator de transcrição Gata-binding protein-3 (GATA-3) que regula a expressão destas citocinas (YAGI & ZHU, 2011). As citocinas de padrão tipo auxiliar (Th2), especialmente IL-4, têm um papel importante no controle da resposta imune tipo Th1 e podem interferir com a capacidade do hospedeiro para lidar com a infecção e exercem papel regulador sobre a ativação de macrófagos induzidas pelo IFN- γ , inibem a liberação de metabolitos tóxicos e a diferenciação de células com perfil Th1, impedindo a inflamação tecidual excessiva. É evidente que o controle efetivo da infecção pode ocorrer apenas quando células interagem e se ativam entre si no microambiente adequado (SILVA *et al.*, 1992; SOARES *et al.*, 2001; TALVANI *et al.*, 2000; TEIXEIRA *et al.*, 2002; LAUCELLA *et al.*, 2004; MARINO *et al.*, 2004). Animais que são deficientes de IL-4 mostram uma polarização Th1, cursando desta forma com um parasitismo reduzido e também com intensa miocardite, porém, a IL-4 demonstra ter um papel menor na regulação da resposta imune na doença de Chagas (HOLSCHER *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2001).

Na última década foi caracterizada uma nova linhagem de linfócitos T auxiliares, denominadas células Th17, as quais produzem IL-17, IL-21, IL-22 e TNF- α (PARK *et al.*, 2005). A diferenciação das células T para o perfil Th17 se dá pela presença de TGF- β e IL-6 na ativação das células. Estas citocinas ativam STAT-3, que aumenta a expressão do fator de transcrição *receptor-related orphan receptor γ -t* (ROR γ t); os fatores aumentam a produção da citocina pró inflamatória IL-17 (YANG *et al.*, 2011). Essa subpopulação de linfócito T tem sido relacionada com a patogênese de doenças autoimunes. No entanto, alguns trabalhos sugerem que a IL-17 é muito importante para o controle da carga parasitaria na infecção pelo *T. cruzi*, contudo, aumenta a miocardite e a mortalidade. Essas alterações parecem estar relacionadas à produção e ao influxo de células inflamatórias para o tecido cardíaco

(GUEDES *et al.*, 2010).

As células T-reguladoras são caracterizadas pela presença do fator de transcrição forkhead box protein 3 (Foxp3) e atuam regulando resposta imune pró-inflamatória, podendo suprimir atividade efetora de diversos subtipos de células T auxiliares, a fim de evitar danos ao hospedeiro, causados por uma resposta inflamatória excessiva, maiores do que a presença do micro-organismo (JOSEFOWICZ & LU, 2012; NUNES-ALVES & BOOTY, 2014).

Citocinas imunoregulatórias, como TGF- β e IL-10, também têm importante papel no controle da resposta imune durante a infecção com *T. cruzi* e modelos experimentais reforçam a importância destas citocinas. Camundongos deficientes de IL-10 exibem uma forte resposta inflamatória e embora controlem bem o parasitismo, sucumbem perante uma resposta inflamatória exacerbada. A depleção de IL-12 tem um efeito retardante na morte destes animais (HUNTER *et al.*, 1997), reforçando o papel deletério da resposta inflamatória exagerada. Outro aspecto importante no que diz respeito às citocinas que imunoregulam a resposta anti-*T. cruzi* é a demonstração de que mRNA de IL-4 e IL-10 já são observados 15 dias após a infecção, sugerindo sua participação desde os eventos iniciais da doença (GOLGHER & GAZZINELLI, 2004).

Um importante aspecto a ser considerado na imunoregulação da resposta imune na doença de Chagas é a possibilidade de utilização destas vias, por parte do parasito, a fim de escapar dos mecanismos imunes efetores, promovendo assim sua sobrevivência e estabelecimento de uma infecção crônica (GOLGHER & GAZZINELLI, 2004). De fato, os efeitos, principalmente de IL-10 e TGF- β tem repercussões diretas na capacidade microbicida dos macrófagos (SILVA *et al.*, 1991; 1992). Outro aspecto importante relacionado com esta imunoregulação é a participação das células T reguladoras, especialmente as ditas “naturais”, que tem um fenótipo CD4⁺CD25⁺, na doença de Chagas; embora sua participação exata, e de outras células reguladoras, na doença de Chagas ainda necessita ser determinada (GOLGHER & GAZZINELLI, 2004).

Os fatores envolvidos na mudança do padrão inflamatório não têm sido bem esclarecidos, mas poderiam estar favorecidos por fatores genéticos e ambientais, além das características do próprio parasito. Este é um aspecto importante que adiciona complexidade na evolução clínica da doença de Chagas, para saber se as alterações imunológicas são a causa ou a consequência da evolução da doença

(DUTRA *et al.*, 2005).

A coexistência da persistência parasitária e de fenômenos autoimunes, poderia ser explicada com o fato de que a presença do parasito seria o fator que provocaria o estímulo ativador de células T específicas e uma vez secretadas as citocinas inflamatórias, seriam capazes de produzir lesão cardíaca; isto liberaria autoantígenos (como a miosina) que são reconhecidos por outro grupo de células T reativas e autoanticorpos, contribuindo para maior dano cardíaco (CUNHA-NETO & TEIXEIRA, 2006; MARIN-NETO *et al.*, 2007).

Este dano cardíaco parece favorecer a indução de moléculas co-estimulatórias necessárias para a correta ativação das células T autoreativas. Neste ponto, uma baixa carga parasitária ativaria as células T regulatórias (Tregs) suprimindo uma resposta auto-imunopatogênica, mas se a carga parasitária ou moléculas que mimetizem antígenos parasitários estiverem em altas concentrações, estimulam a secreção de células T autoreativas patogênicas (VRAY *et al.*, 2004).

Em humanos, as variações imunológicas apresentadas estão relacionadas à evolução clínica dos pacientes chagásicos, onde os pacientes com a forma indeterminada parecem ter uma resposta mais regulada, enquanto os pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica grave desenvolvem resposta inflamatória mais intensa, demonstrando uma imunodominância relacionada às diferentes fases e formas clínicas da doença (BRENER & GAZZINELLI, 1997; ABEL *et al.*, 2001; D'AVILA *et al.*, 2009). Estudos demonstraram que os pacientes da forma indeterminada apresentam características moduladoras, como baixa expressão da molécula HLA-DR e alta expressão de IL-10, enquanto pacientes com a forma cardíaca da doença têm uma resposta inflamatória excessiva devido à alta expressão de TNF- α . Sendo assim, as diferentes formas clínicas da doença de Chagas apresentam perfis fenotípico-funcionais distintos, sugerindo uma dicotomia nos mecanismos de controle e desenvolvimento da patologia cardíaca (SOUZA *et al.*, 2004). Foi sugerido que indivíduo com doença na forma severa tenha uma tendência a produzir mais IFN- γ comparado com os pacientes indeterminados sob estimulação com antígenos do parasita (GOMES *et al.*, 2003) e que clones de células T derivadas dos corações de pacientes cardíacos produza predominante IFN- γ (ABEL *et al.*, 2001). Uma correlação entre níveis de TNF- α e a ocorrência das formas graves da doença tem sido sugerida (TALVANI *et al.*, 2004) (Figura 4).

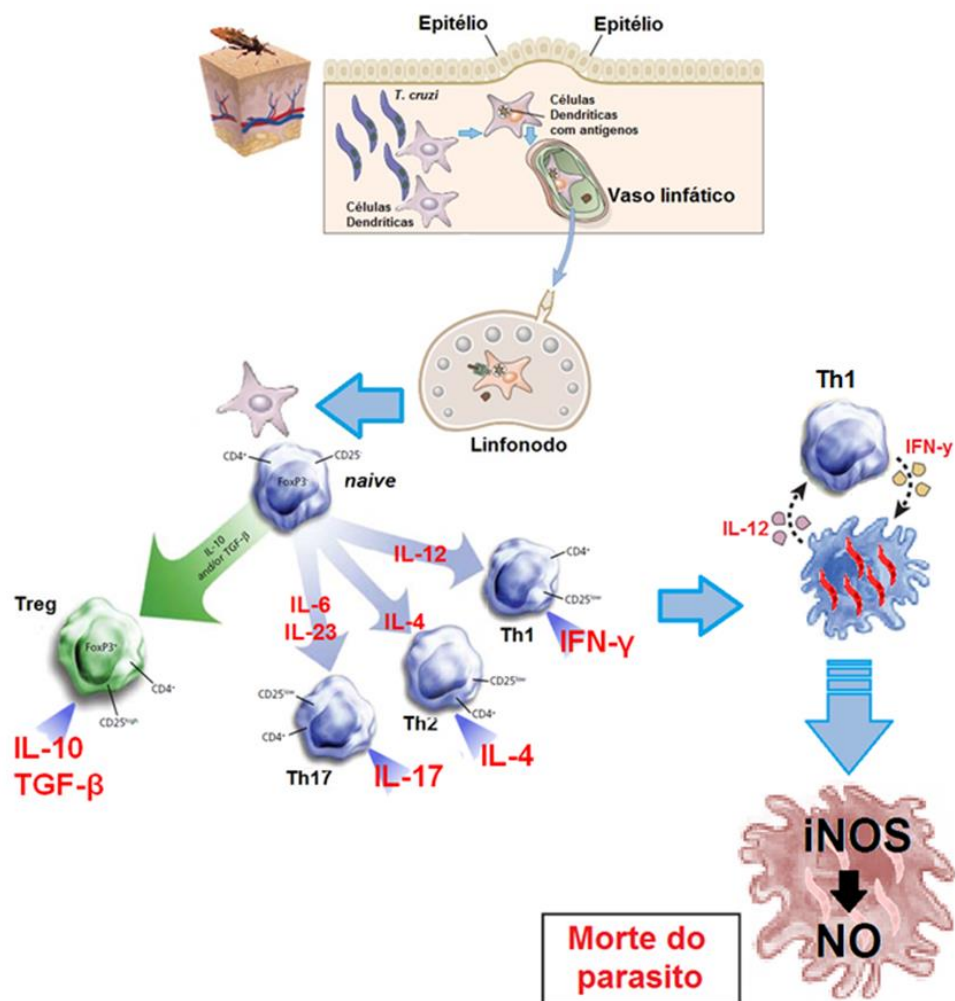


Figura 4- Resposta imunológica. Fonte: Adaptado de PARK *et al.*, 2005.

1.5 Adipocitocinas: Leptina

O tecido adiposo produz mediadores bioativos denominados adipocitocinas. As principais adipocitocinas são a adiponectina e a leptina (BERG *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2006).

A adiponectina tem efeitos anti-inflamatórios e antiaterogênico e ações de sensibilização a insulina, enquanto a leptina promove atividade pró-inflamatória e pró-trombótica, proliferação neointimal, disfunção endotelial e indução a resistência à insulina (FILIPPATOS *et al.*, 2000; SCHULZE *et al.*, 2003).

Os adipócitos são a principal fonte de síntese e secreção de adipocitocinas (TARTAGLIA *et al.*, 1995; LOLLMANN *et al.*, 1997; AHIMA *et al.*, 2000; ZEIDAN *et al.*, 2011). Além do tecido adiposo, as adipocitocinas podem ser secretadas em menor quantidade pela placenta em humanos, músculo esquelético e estômago de ratos (MAFFEI *et al.*, 1995; FREDERICH *et al.*, 1995; HAMILTON *et*

al.,1995; LONNQVIST *et al.*,1995; CONSIDINE *et al.*,1996).

A leptina tem sua secreção aumentada por mediadores, tais como: citocinas inflamatórias, insulina, glicose, estrogênio e glicocorticoides (BERG *et al.*, 2005; GUZIK *et al.*, 2006). Geralmente a leptina está associada com a regulação central da saciedade e metabolismo energético, evidências indicam que a leptina pode ser um importante mediador na fisiopatologia de doenças cardiovasculares (WOLK *et al.*, 2004).

Acredita-se que leptina contribua para remodelação cardíaca e desenvolvimento de fibrose no sistema cardiovascular em ratos obesos através da indução da síntese de colágeno tipo I e mediadores pró-fibróticos tais como: fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) em fibroblastos cardíacos e células musculares lisas vasculares (VSMCs) (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2014).

Alterações na resistência à insulina e nos adipócitos pode conduzir a um estado inflamatório sistêmico que contribui para vasculopatia e risco de doenças cardiovascular (BERG *et al.*, 2005). No tecido adiposo temos os macrófagos residentes, que são conhecidos por serem contribuintes cruciais para a inflamação e assim como os macrófagos os adipócitos são sensíveis a microrganismos e a sinais inflamatórios mediados por citocinas. Os adipócitos expressam vários receptores que lhes permitem detectar a presença de patógenos e inflamação, e na estimulação desses receptores, ocorre a ativação de várias cascatas de transdução de sinal inflamatório, induzindo a secreção de uma série de citocinas inflamatórias e proteínas de fase aguda (RYDEN *et al.*, 2002).

Ferreira e colaboradores (2011) observaram a persistência do *T. cruzi* em adipócitos humanos com cardiopatia chagásica crônica. No entanto, os dados são poucos em relação aos níveis de adipocitocinas na doença de Chagas nesse trabalho.

Em pacientes com doença de Chagas, os níveis de leptina estavam reduzidos em pacientes com cardiopatia quando comparados com os indivíduos que apresentavam a forma indeterminada. Pacientes chagásicos com cardiopatia podem apresentar lesões no sistema nervoso central, despovoamento neuronal cardíaco e aumento da atividade simpática no tecido adiposo amarelo, resultando na diminuição da secreção de leptina (FERNANDES *et al.*, 2007).

Em 2005, Coombs *et al* desenvolveram um estudo com ratos infectados durante a fase aguda da doença de Chagas, demonstrando que os adipócitos

infectados com *T. cruzi* demonstram mudanças na secreção de adipocitocinas, com diminuição dos níveis de adiponectina e leptina e aumento dos níveis de IL-6 e TNF- α .

Nagajyothi *et al.* (2012) também mostrou o aumento de expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a IFN- γ e o TNF- α e redução dos níveis de adiponectina em cultura de adipócitos infectados com *T. cruzi*. Foi demonstrado também que 15 dias após a infecção pelo *T. cruzi*, há uma carga parasitária significativa tanto no tecido adiposo marrom quanto no amarelo, em comparação com outros órgãos como o coração e o baço em camundongos.

Diante disso, é de grande relevância elucidar os mecanismos imunopatológicos envolvido na infecção chagásica. Especialmente, a importância do hormônio pró-inflamatório produzido pelo tecido adiposo, a leptina e sua relação com as citocinas. O presente trabalho avaliou a infecção com a cepa Colombiana de *T. cruzi* que apresenta miotropismo em modelos experimentais nocautes para citocinas polares e sua relação com a produção sérica de leptina.

JUSTIFICATIVA

Mais de cem anos após a descoberta da doença de Chagas ainda não se sabe a causa das diferentes formas das manifestações clínicas da doença. Acredita-se que a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro na fase aguda determina o desfecho da doença na fase crônica, em especial da cardiopatia chagásica, responsável por 30% das manifestações.

Para estudar a fase aguda da doença de Chagas tem se utilizado modelos experimentais, em especial, camundongos, pois esse modelo mimetiza a resposta imunológica e consequentemente a miocardite desenvolvida em seres humanos. Dessa forma, estudos tem utilizado animais nocautes para mediadores alvos da resposta imunológica afim de avaliar as alterações morfológicas desenvolvidas frente a infecção pelo *T. cruzi*.

Nos últimos anos tem se dado atenção a outros mediadores produzidos em sítios não imunológicos, mas que tem ação direta ou sinérgica com mediadores inflamatórios, neste contexto, as adipocitocinas, em especial a leptina tem sido cogitada como um mediador inflamatório com ação de remodelamento frente a algumas cardiopatias inflamatórias.

Dessa forma, a avaliação da expressão de citocinas e leptina pode contribuir para o entendimento das alterações morfológicas desenvolvida na infecção aguda pelo *T. cruzi*.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Avaliar aspectos imunopatológicos em camundongos C57Bl/6 WT, Balb-c WT, C57BL/6 KO IFN- γ , Balb-c KO IL-4 infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* na fase aguda da doença de Chagas experimental.

Objetivos Específicos:

1. Avaliar a presença de ninhos de amastigotas no coração dos animais infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi*;
2. Avaliar a miocardite no coração dos animais infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi*;
3. Avaliar fibrose no coração dos animais infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* e nos animais dos grupos controles;
4. Avaliar a expressão de IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10, e IL-17 *in situ*, no homogenato cardíaco, dos animais infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* e nos animais dos grupos controles;
5. Avaliar os níveis séricos de leptina, IL-10 e TNF- α nos animais infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* e nos animais dos grupos controles.

MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Animais

Todos os procedimentos que foram realizados com os animais estão de acordo com as normas propostas pela Sociedade Brasileira de Ciência em animais de Laboratório - SBCAL. O projeto foi submetido à Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UFG), aprovado com protocolo de nº 119/14.

No presente trabalho foram estudados animais machos da linhagem C57Bl/6 WT, C57Bl/6 KO IFN- γ Balb-c WT, Balb-c KO IL-4. O estudo foi composto por oito grupos de animais, sendo quatro grupos não infectados C57Bl/6 WT, C57Bl/6 KO IFN- γ , Balb-c WT, Balb-c KO IL-4, e os outros quatro grupos C57Bl/6 WT, C57Bl/6 KO IFN- γ , Balb-c WT, Balb-c KO IL-4 infectados via subcutânea com 100 formas tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*, com idade 10 semanas e com peso de 20 a 25 gramas.

Os animais foram mantidos por 21 dias no biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG em racks ventilados e mini-isoladores, a uma temperatura entre 20 e 25° C e ciclo claro-escuro de 12 horas. A alimentação foi feita com ração comercial. A água para beber foi oferecida *ad libitum*. O alimento, a água para beber e a serragem, que serviu de forragem para as gaiolas, passaram pelo processo de esterilização em autoclave antes de serem oferecidos aos animais. Durante o período de experimento, os animais foram supervisionados diariamente para verificação de eventuais óbitos.

Os grupos estudados estão detalhados na tabela abaixo:

Tabela 1 – Distribuição da casuística conforme grupo de animais

<i>Número de animais</i>	<i>Grupo</i>	
8	C57Bl/6 WT	Infectado
7	Balb-c WT	Infectado
9	C57Bl/6 KO IFN- γ	Infectado
7	Balb-c KO IL-4	Infectado
5	C57Bl/6 WT	Controle
5	Balb-c WT	Controle
5	C57Bl/6 KO IFN- γ	Controle
5	Balb-c KO IL-4	Controle

1.2 Obtenção do *Trypanosoma cruzi* para inóculo em camundongos

Para produzir a infecção nos camundongos foram utilizados tripomastigotas sanguíneos provenientes de camundongos Swiss, previamente infectado (WAYNFORTH & FLECKNELL, 1992). O número de parasitas foi determinado em 50 campos em um volume de 5µl de sangue entre lâmina e lamínula e o inóculo foi ajustado para concentração de 100 tripomastigotas sanguíneos/mL, administrados por via subcutânea nos camundongos.

Após 21 dias de infecção os animais foram eutanasiados. Para isso eles foram anestesiados com a administração de 10 UI de anestésico (0,01 ml/g de Xilazina a 2% e Ketamina 10%), seguido de coleta do sangue por punção cardíaca com posterior necropsia, através da incisão dorsolateral, coletando-se o coração para estudo *in situ* através da incisão ventral das cavidades torácicas e abdominal. As demais vísceras de interesse foram coletadas e armazenadas em freezer -80° para análises posteriores.

1.3 Processamento de lâminas

Os fragmentos do coração foram fixados em formoldeído 4% por pelo menos 24 horas. Após a fixação, foram submetidos ao processo de desidratação em uma série crescente de alcoóis etílicos, diafanização em xilol e inclusão em parafina, posicionando os fragmentos com seu eixo longitudinal perpendicular ao plano de microtomia. Obtendo-se então, cortes transversais e, para cada coração, dois cortes seriados com 4µm de espessura. Os cortes foram aderidos às lâminas com o adesivo entellan e submetidos à secagem. As lâminas de número 1 foram coradas pela Hematoxilina e Eosina. Nas lâminas de número 2 foram realizadas as colorações pelo picro-sírius.

1.4 Quantificação dos ninhos de amastigotas

O parasitismo tissular foi avaliado através da quantificação do número de ninhos de *T. cruzi* no miocárdio, a fim de confirmarmos a infecção. Para isso, foram analisadas três lâminas com cortes seriados em microscópio de luz comum. Os animais do grupo infectado que não apresentaram ninhos foram excluídos do estudo.

1.5 Quantificação do infiltrado inflamatório

Para a quantificação do infiltrado inflamatório, foram utilizadas as

lâminas de fragmentos cardíacos coradas pela Hematoxilina e Eosina (HE). O infiltrado inflamatório foi analisado de forma semi-quantitativa, sendo classificado em discreto (<10%), moderado (10-50%) e intenso (>50%) da lâmina. (MACHADO *et al.*, 2014).

1.6 Quantificação da fibrose

A avaliação morfométrica da deposição de colágeno foi realizada nos cortes do coração, corado pelo picro-sírius (solução aquosa saturada e ácido pícrico adicionada de 0,1g% de vermelho da Síria F3b, *Sirius red F3B- Bayer*). A fibrose foi quantificada através de imagens das lâminas em objetiva de 10x, capturadas utilizando-se uma câmera de vídeo digital acoplada a um microscópio de luz comum, que envia as imagens para um computador para serem capturadas pelo programa de imagem *LAS V 4.4*. As imagens assim capturadas (10 campos por lâmina) foram gravadas para posterior utilização com o programa de análise de imagem *Image J*. A avaliação morfométrica da deposição de colágeno (fibrose) foi realizada utilizando as imagens das lâminas coradas pelo picro-sírius e o resultado foi expresso em porcentagem de área (SOUZA *et al.*, 2007).

1.7 Homogenato cardíaco

A produção de citocina *in situ* foi dosada no homogenato cardíaco com posterior realização do ELISA. O órgão foi deixado no gelo, ápice cardíaco foi pesado e posteriormente foi feito o macerado com a utilização de um macerador específico para tecido, adicionado inibidor de protease (1/100), tampão Tris-HCL (50mM), NaCL (150mM) e o detergente p40 (1%). O homogenato foi submetido a centrifugação a 12000rpm por 20 minutos a 4°C, com o sobrenadante obtido foi realizado do teste de ELISA Sanduiche para dosagem de citocinas, essa dosagem foi ajustada de acordo com o peso do coração.

1.8 ELISA do homogenato cardíaco e do plasma

A avaliação dos níveis de IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17 no homogenato cardíaco e a dosagem de leptina no soro, foram realizadas pelo método do ensaio imunoenzimático (ELISA) sanduiche. Foi utilizado os clones de anticorpos C18.32 (cobertura) e C17.8 (biotinilado) para IL-12p70; kit comercial da BD (Biosciences-US) para TNF- α ; XMG 1.2 (cobertura) AN18 (biotinilado) para IFN- γ ;

11B11 (cobertura) BVD6-24G2 (biotinilado) para IL-4; kit comercial da PEPROTECH para IL-10; kit comercial da Biolegend para IL-17; kit comercial da PEPROTECH para leptina. A curva padrão foi obtida com citocinas recombinantes de camundongos (R&D Systems).

O anticorpo de cobertura foi diluído em PBS e adicionado 80µl por poço em placa de 96 poços (Costar) permanecendo por 24 h a 4°C. Após esse tempo a placa foi lavada de 4 a 6 vezes com PBS contendo 0,02% de tween 20 (InLAB) (PBS-Tween) para retirar os anticorpos que não foram aderidos e em seguida foram adicionados 160 µl por poço de solução bloqueio (SBF 3% em PBS) permanecendo por 1h em temperatura ambiente. Após esse período, a placa foi lavada de 4 a 6 vezes com PBS-Tween e em seguida foram adicionados 50 µl do sobrenadante das amostras e a curva padrão com diluição seriada com citocinas obtidas da R&D Systems. As placas permaneceram por um período de 24h a 4°C. Novamente a placa foi lavada de 4 a 6 vezes com PBS-Tween e adicionado o anticorpo biotinilado específico que permaneceu por um período de 1h em temperatura ambiente. Posteriormente a placa foi lavada de 4 a 6 vezes novamente para posterior adição da enzima estreptavidina conjugada com peroxidase (Invitrogen) diluída de 1:1000. Está permaneceu de 20 a 30 minutos a temperatura ambiente. E por fim, a placa foi lavada de 4 a 6 vezes e então adicionado o substrato TMB (Invitrogen) para revelar a reação, que foi interrompida com 20 µl de H₂SO₄ e lida em leitora de microplacas a 450 e 620nm.

A dosagem de leptina foi semelhante ao protocolo anterior, porém a solução de bloqueio foi 300 µl por poço da solução (Albumina 1% em PBS 1x) e o volume das amostras foi de 50 µl do soro, a curva padrão começou a 2ng, o substrato utilizado foi ABST para revelar a reação e a leitura foi feita em filtro de 405 nm.

Com exceção dos kits comerciais, todos os anticorpos para ELISA foram obtidos a partir de hibridomas que foram doados pelo Dr. Giorgio Trinchieri (National Cancer Institute, EUA) ou Dr. Ises de Almeida Abrahamshon (ICB, USP, São Paulo, Brasil). As produções destes anticorpos são feitas como rotina no laboratório de Citocinas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP (UFG).

1.9 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada por meio do programa *Graphpad Prism* 6.0 (graphpad software - EUA). As variáveis qualitativas foram analisadas através do teste de qui-quadrado (X^2). Para avaliação das variáveis quantitativa primeiramente foi verificada a homogeneidade dos dados por meio do teste de Kolmogorv-Smirnov. As variáveis contínuas que apresentaram distribuição normal foram expressas em média $\pm$ desvio padrão e aquelas que apresentaram distribuição não normal foram expressas em mediana (com valores mínimos e máximos e percentis). Para comparação entre dois grupos (C57Bl/6 WT versus C57Bl/6 KO IFN ou Balb-c WT versus Balb-c KO IL-4) foi utilizado o teste “*t*” não pareado para os dados com distribuição normal e teste de Mann Whitney (U) para os dados com distribuição não normal. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

1.1 Ninhos de amastigotas

Para avaliar o parasitismo tissular, foi utilizada a lâmina corada por HE, onde foi feita a contagem de ninhos *T. cruzi* no miocárdio, nos grupos C57Bl/6 WT, C57Bl/6 KO IFN- γ , Balb-c WT e Balb-c KO IL-4, infectados por 21 dias com a cepa Colombiana.

O grupo C57Bl/6 KO IFN- γ apresentou maior número de ninhos de amastigotas em relação ao grupo C57Bl/6 WT ($p=0,0093$; teste “*t*” não pareado). A comparação entre os grupos Balb-c WT versus Balb-c KO IL-4 não apresentou diferença estatística (teste “*t*” não pareado). (Figura 5, Prancha 1A e B).

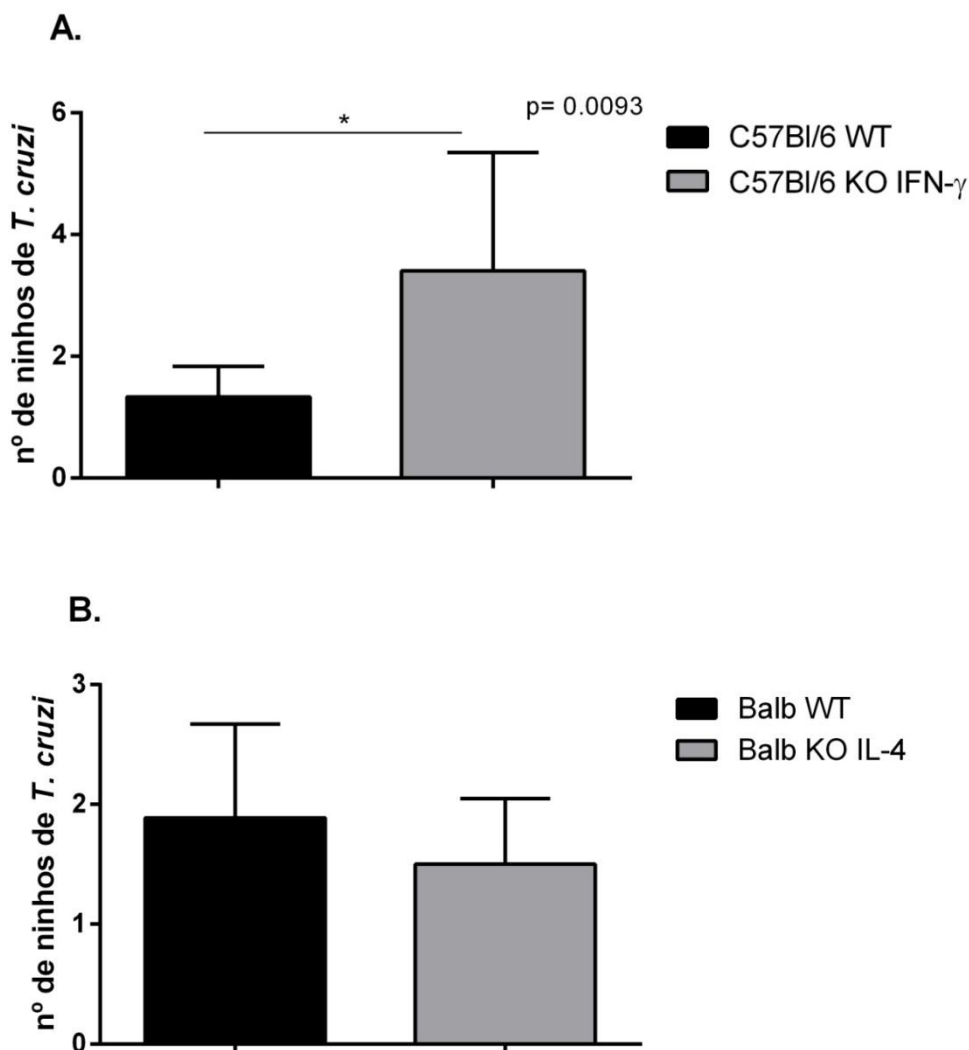


Figura 5 – Ninhos de *T. cruzi* no coração de camundongos das linhagens C57Bl/6 WT, C57Bl/6 KO IFN- γ , Balb-c WT e Balb-c KO IL-4. O eixo das ordenadas (n) o número de ninhos por lâmina, enquanto o eixo das abcissas representa as diferentes linhagens de animais. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. * $p<0,05$, teste “*t*” não pareado.

1.2 Infiltrado inflamatório

A análise do infiltrado inflamatório cardíaco foi realizada entre o grupo C57Bl/6 WT versus C57Bl/6 KO IFN- γ ou Balb-c WT versus Balb-c KO IL-4 infectados com a cepa Colombiana na fase aguda da doença de Chagas experimental (Figura 6, Prancha 1A e B).

Não houve diferença estatística quando comparados os grupos C57Bl/6 WT versus C57Bl/6 KO IFN- γ ou Balb-c WT versus Balb-c KO IL-4 (Figura 6).

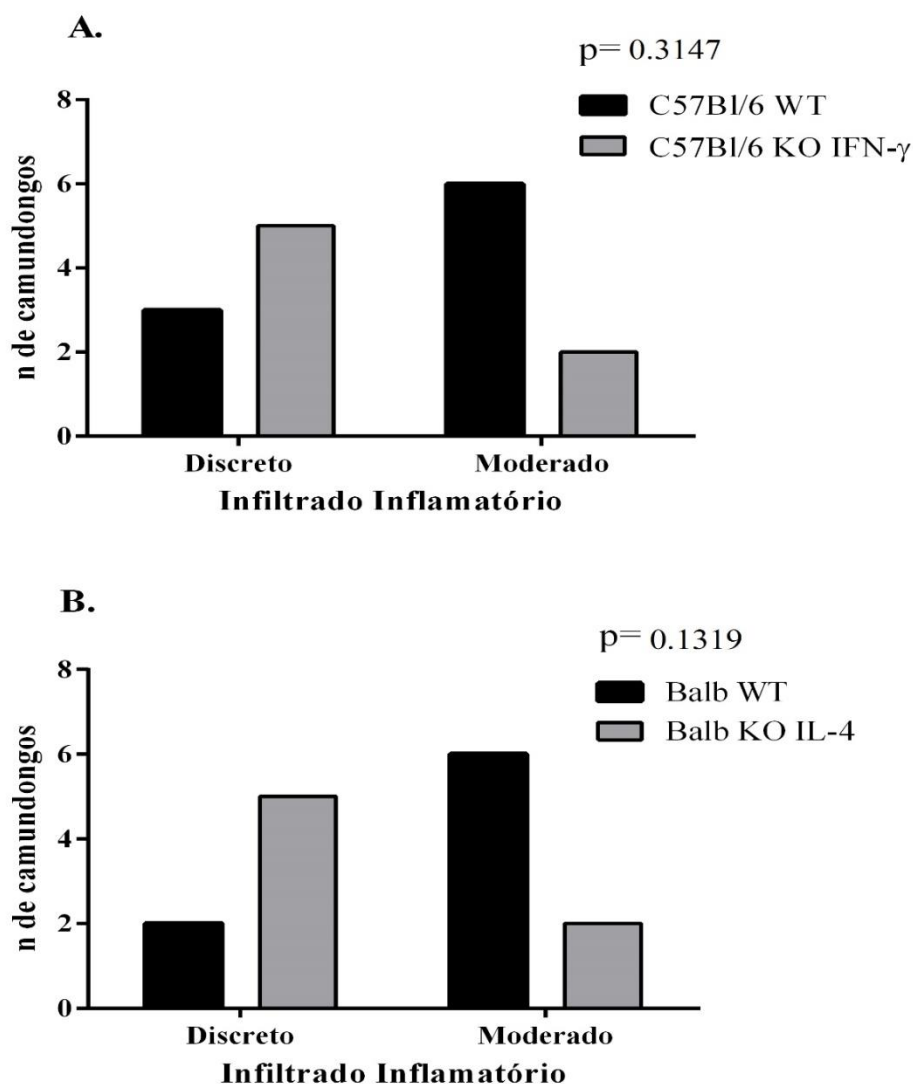


Figura 6 – Infiltrado inflamatório no coração de camundongos das linhagens C57Bl/6 WT, C57Bl/6 KO IFN- γ , Balb-c WT e Balb-c KO IL-4 infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi*. O eixo das ordenadas (n) representa o número de animais cujo score atribuído para o infiltrado inflamatório foi discreto ou moderado e o eixo das abcissas representa as diferentes linhagens de camundongos. **A.** Intensidade do infiltrado inflamatório em C57Bl/6 WT comparando a C57Bl/6 KO IFN- γ . **B.** Intensidade do infiltrado inflamatório em Balb-c WT, comparando Balb-c KO IL-4. Para análise das proporções foi utilizado teste de Exato de Fisher, e considerado significativo quando $p < 0,05$.

1.3 Fibrose

A análise da fibrose foi feita por meio de morfometria na lâmina de coração corada pelo picro-sírius nos camundongos C57Bl/6 WT, C57Bl/6 KO IFN- γ , Balb-c WT e Balb-c KO IL-4, infectados por 21 dias com a cepa Colombiana e grupos controles não infectado. A análise foi realizada entre os grupos C57Bl/6 WT versus C57Bl/6 KO IFN- γ e Balb-c WT versus Balb-c KO IL-4 infectados e não infectados com a cepa Colombiana. Em nenhuma das análises foi observada diferença estatística entre os grupos. (Figura 7 A e B, Teste t).

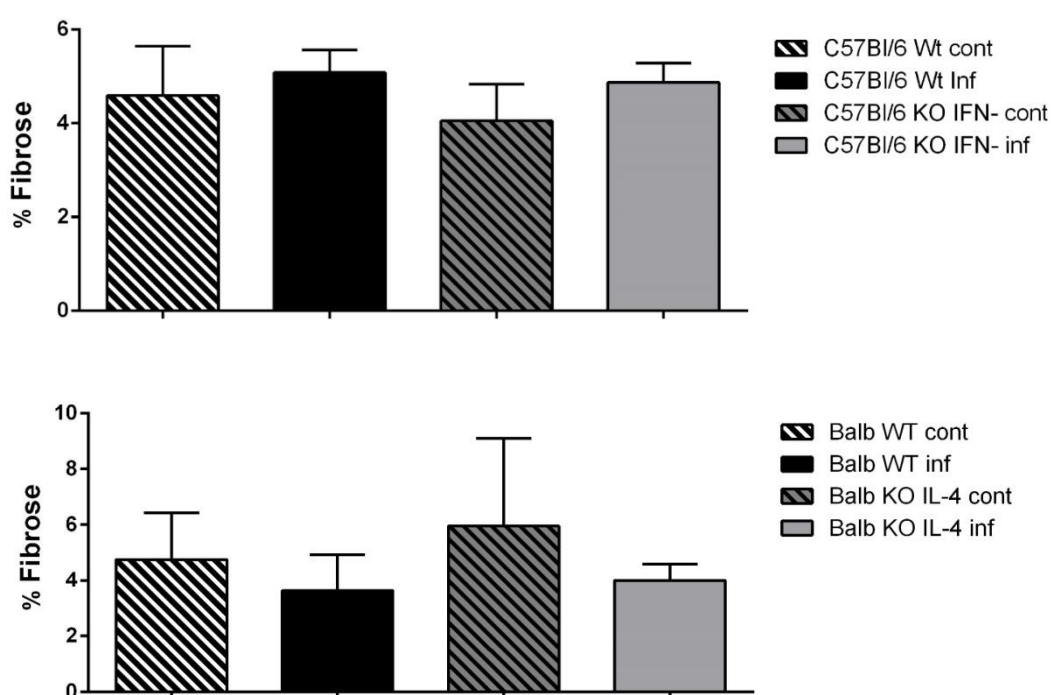


Figura 7 – Percentual (%) de fibrose no coração de camundongos das linhagens **A.** Camundongos C57Bl/6 WT e C57Bl/6 KO IFN- γ **B.** Camundongos Balb-c WT e Balb-c KO IL-4. O eixo das ordenadas indica a média das porcentagens para cada grupo e o eixo das abcissas representa os diferentes grupos e linhagens de camundongos expressos na legenda. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$, Teste t.

1.4 Produção de citocinas *in situ*

A dosagem das citocinas TNF- α , IL-12p70, IL-10, IFN- γ , IL-4 e IL-17 no sobrenadante do homogenato cardíaco foi realizada nos grupos infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* e controles (não infectados) de camundongos C57Bl/6 WT, C57Bl/6 KO IFN- γ , Balb-c WT e Balb-c KO IL-4.

A análise foi realizada entre os grupos C57Bl/6 WT versus C57Bl/6 KO IFN- γ e Balb-c WT versus Balb-c KO IL-4 infectados e não infectados com a cepa

Colombiana. A expressão de TNF- α foi significativamente menor nos animais C57Bl/6 KO IFN- γ não infectados em relação aos C57Bl/6 KO IFN- γ infectados ($p=0,0006$; Mann-Whitney) e houve diferença estatística também entre os grupos C57Bl/6 WT controle em relação ao C57Bl/6 KO IFN- γ controle ($p=0,0258$; Mann-Whitney) (Figura 8A).

Em relação aos grupos Balb-c WT e Balb-c KO IL-4 foi observado uma maior expressão de TNF- α nos grupos infectados quando comparado aos controles ($p=0,0101$; Mann-Whitney; $p=0,0303$, Mann-Whitney, respectivamente) (Figura 8B).

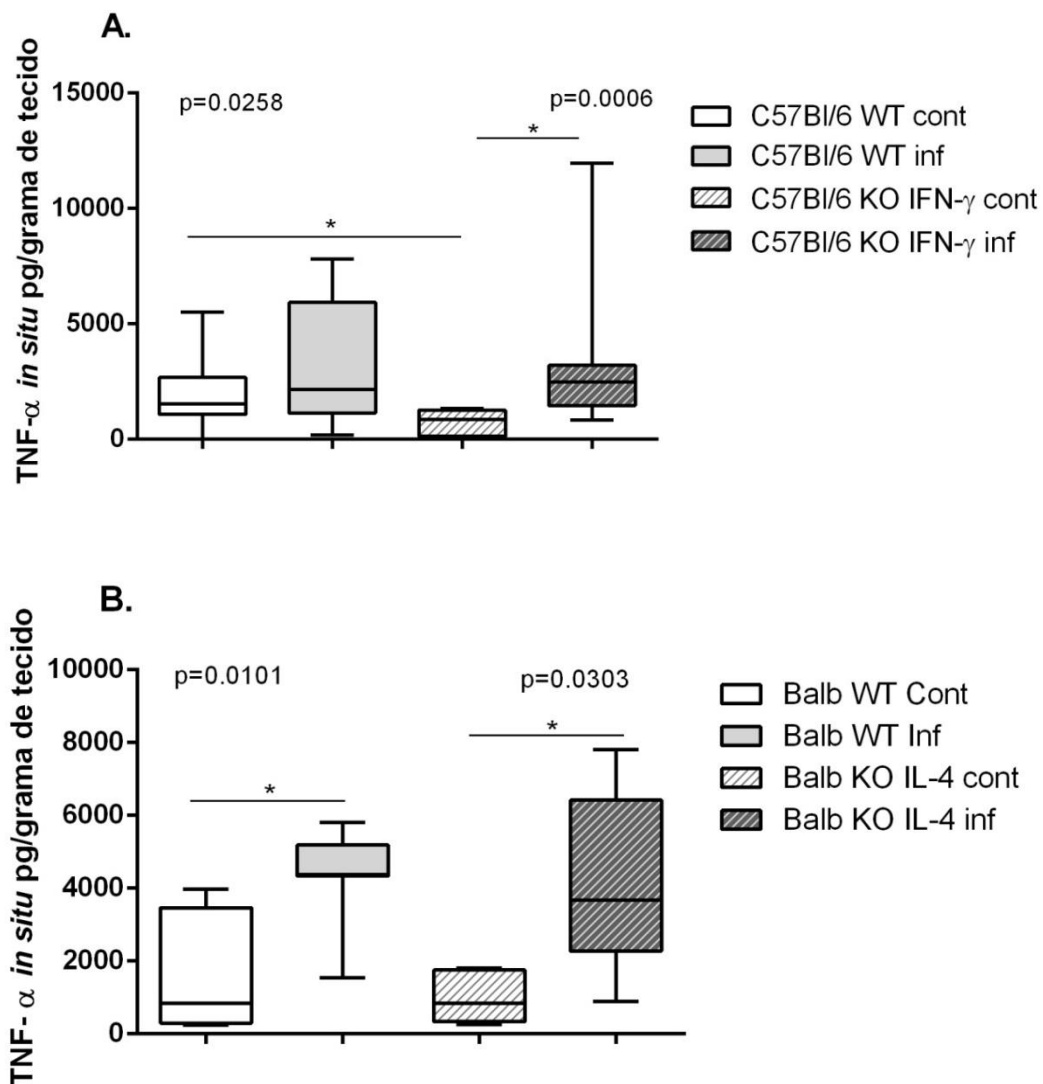


Figura 8– Expressão de TNF- α em picogramas por grama de coração de camundongos infectados e não infectados pela cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*. **A.** Camundongos C57Bl/6 WT e C57Bl/6 KO IFN- γ . **B.** Camundongos Balb-c WT e Balb-c KO IL-4. Diferenças estatisticamente significativa estão marcadas com * ($p<0,05$), teste de Mann-Whitney. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%.

Ao analisar a expressão de IL-12p70, não foram observadas diferenças na expressão de IL-12p70 entre os grupos C57Bl/6, mesmo que os C57Bl/6 WT tenham maior expressão da citocina quando comparados aos grupos C57Bl/6 KO IFN- γ (Figura 9B).

Os animais Balb-c WT infectados apresentaram expressão significativamente maior de IL-12p70 que os animais Balb-c WT não infectados ($p=0,0303$; Mann-Whitney) (Figura 9A).

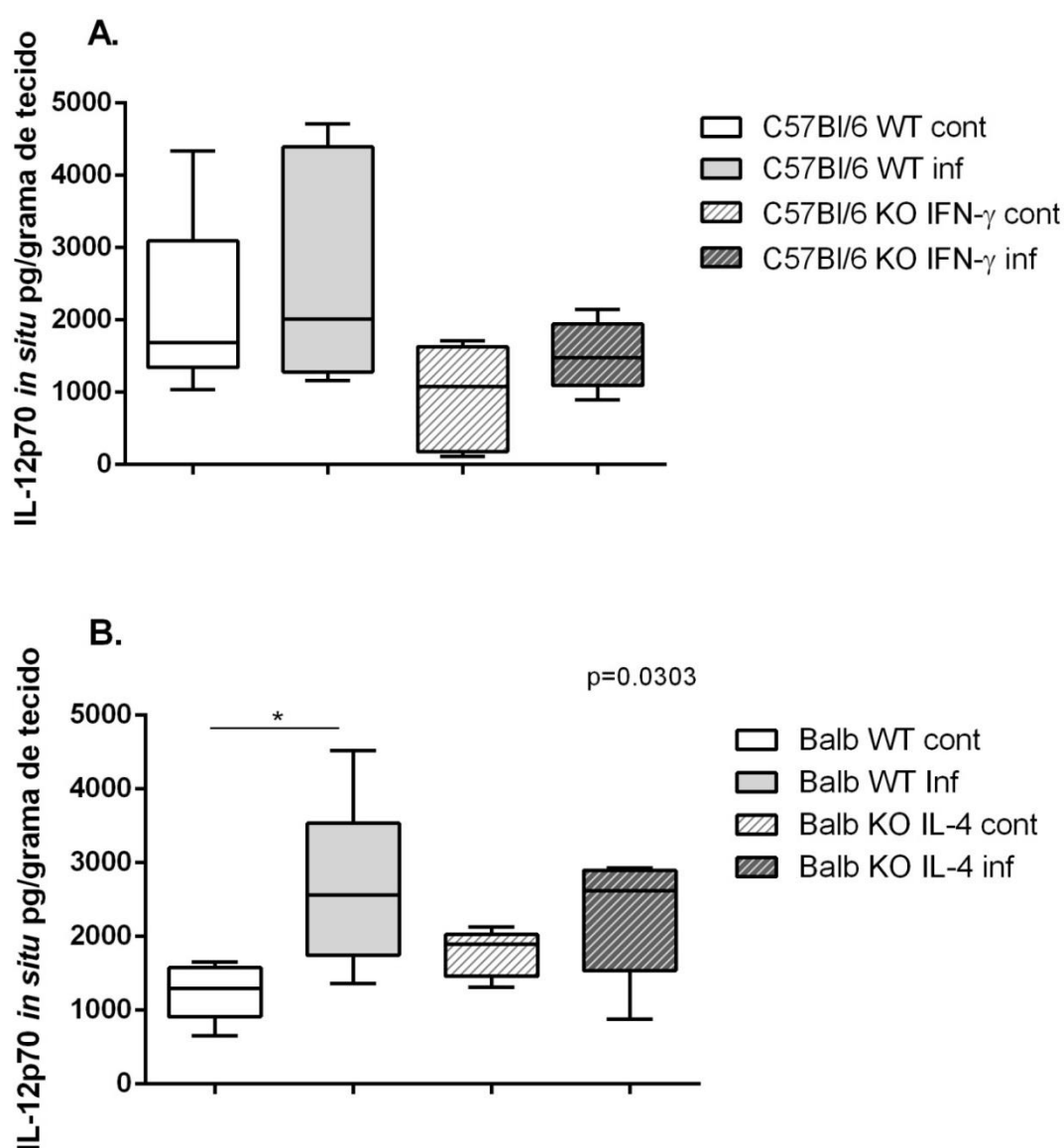


Figura 9 - Expressão de IL-12p70 em picogramas por grama de coração de camundongos infectados e não infectados pela cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*. **A.** Camundongos C57Bl/6 WT e C57Bl/6 KO IFN- γ ; **B.** Camundongos Balb-c WT e Balb-c KO IL-4. Diferenças estatisticamente significativa estão marcadas com * ($p<0,05$), teste de Mann-Whitney. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%.

A expressão de IFN- γ , foi significativamente maior nos animais C57Bl/6 WT infectados em relação aos não infectados ($p=0,0478$; Mann-Whitney), entre os animais C57Bl/6 KO IFN- γ não foram observadas diferenças. Em relação aos grupos Balb-c, a expressão de IFN- γ foi significativamente maior nos Balb-c WT infectado quando comparado aos Balb-c WT não infectado ($p=0,0303$; Mann-Whitney) (Figura 10A e 10B).

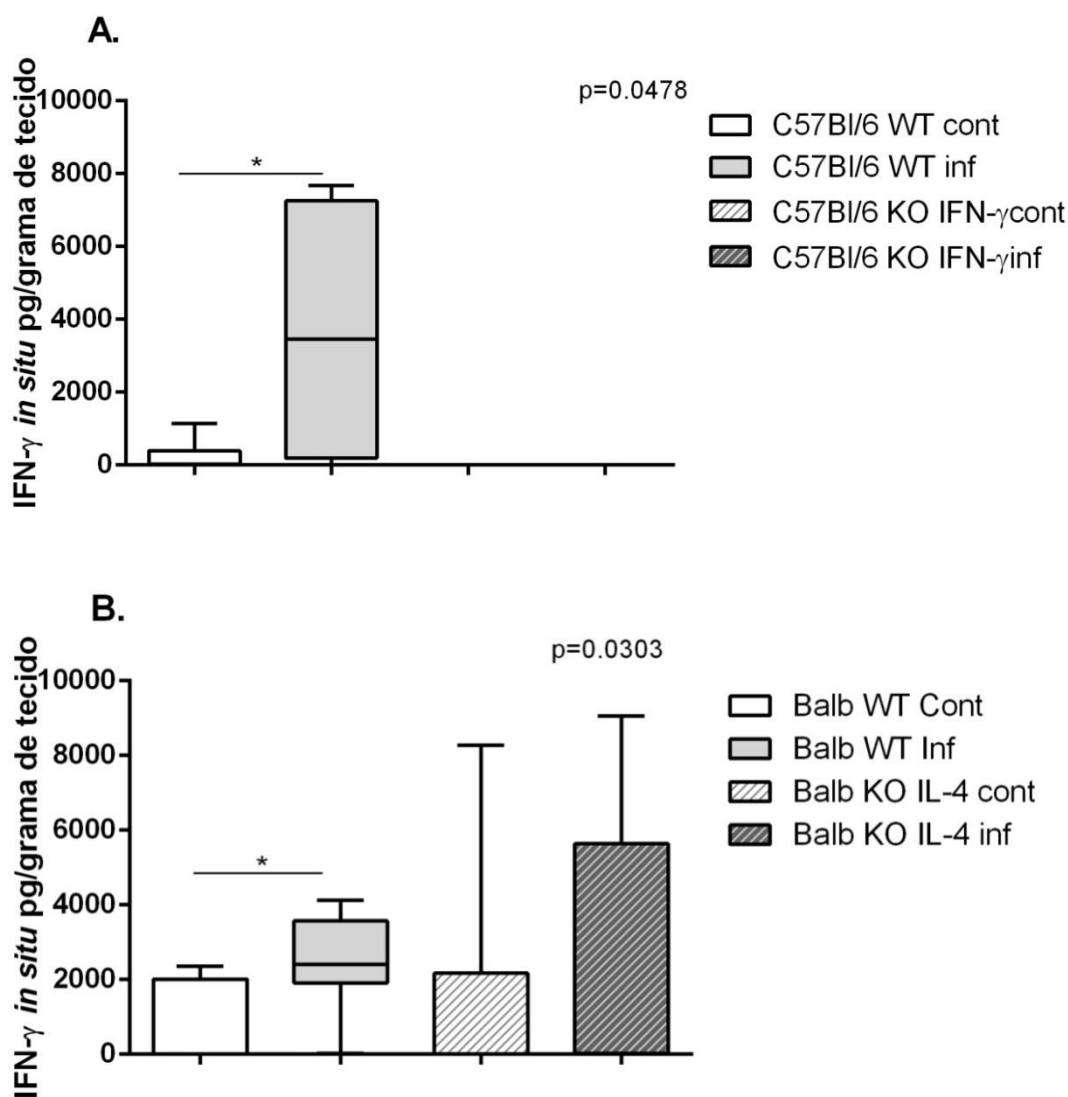


Figura 10 - Expressão de IFN- γ em picogramas por grama de coração de camundongos infectados e não infectados pela cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*. **A.** Camundongos C57Bl/6 WT e C57Bl/6 KO IFN- γ ; **B.** Camundongos Balb-c WT e Balb-c KO IL-4. Diferenças estatisticamente significativa estão marcadas com * ($p<0,05$), teste de Mann-Whitney. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%.

Não foram observadas diferenças na expressão de IL-17 entre os grupos C57Bl/6 (Figura 11A). No entanto a expressão de IL-17 foi significativamente maior

nos animais Balb-c KO IL-4 não infectados em relação aos Balb-c WT não infectados e Balb-c KO IL-4 infectados ($p=0,0087$; Mann-Whitney e $p=0,0519$; Mann-Whitney, respectivamente) (Figura 11B).

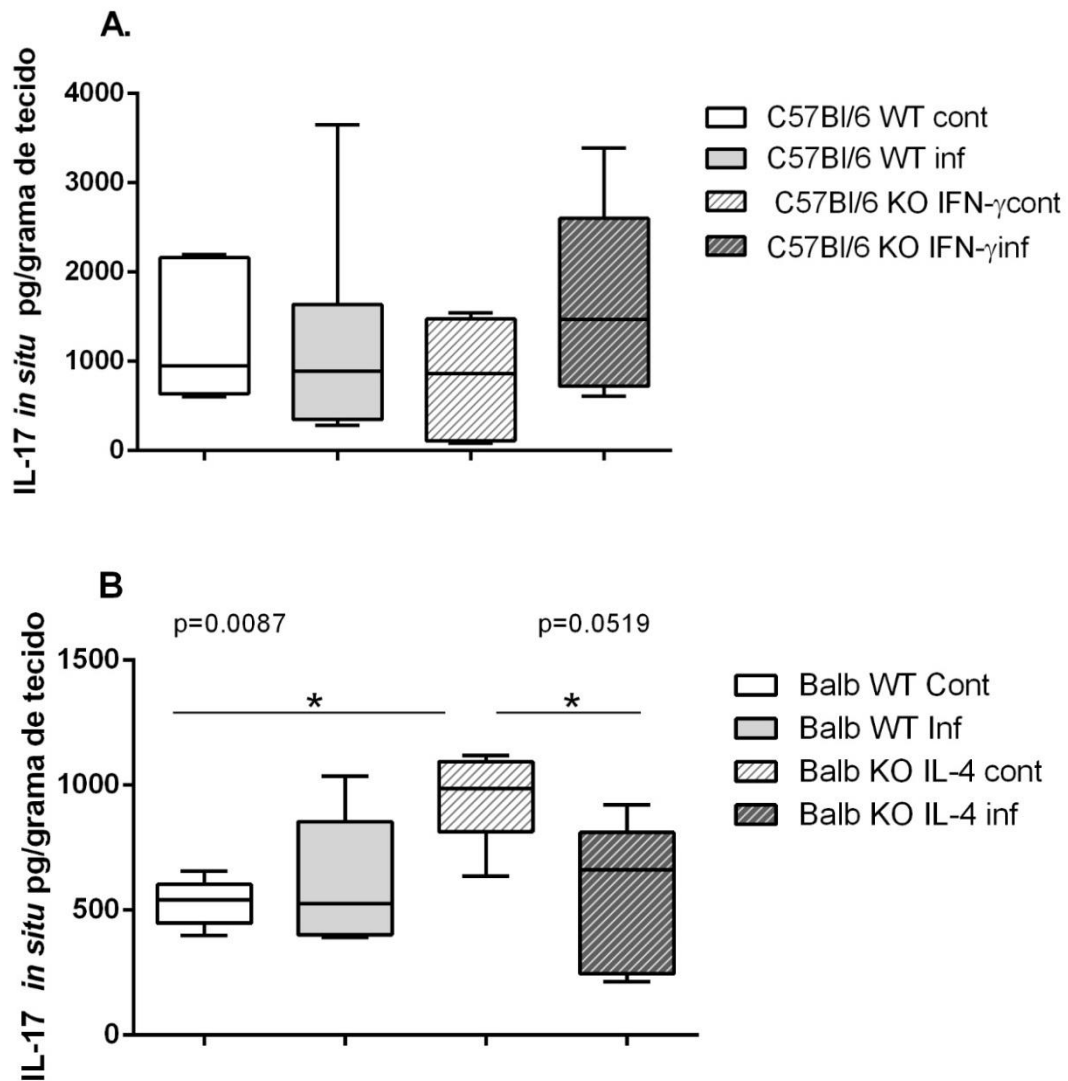


Figura 11 - Expressão de IL-17 em picogramas por grama de coração de camundongos infectados e não infectados pela cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*. **A.** Camundongos C57Bl/6 WT e C57Bl/6 KO IFN- γ ; **B.** Camundongos Balb-c WT e Balb-c KO IL-4. Diferenças estatisticamente significativa estão marcadas com * ($p < 0,05$), teste de Mann-Whitney. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%.

A expressão de IL-10 foi significativamente maior no grupo C57Bl/6 WT controle quando comparado ao C57Bl/6 KO IFN- γ controle ($p=0,0159$; Mann-Whitney). Não foram observadas diferenças significativas na expressão de IL-10 entre os Balb-c (Figura 12A e 12B).

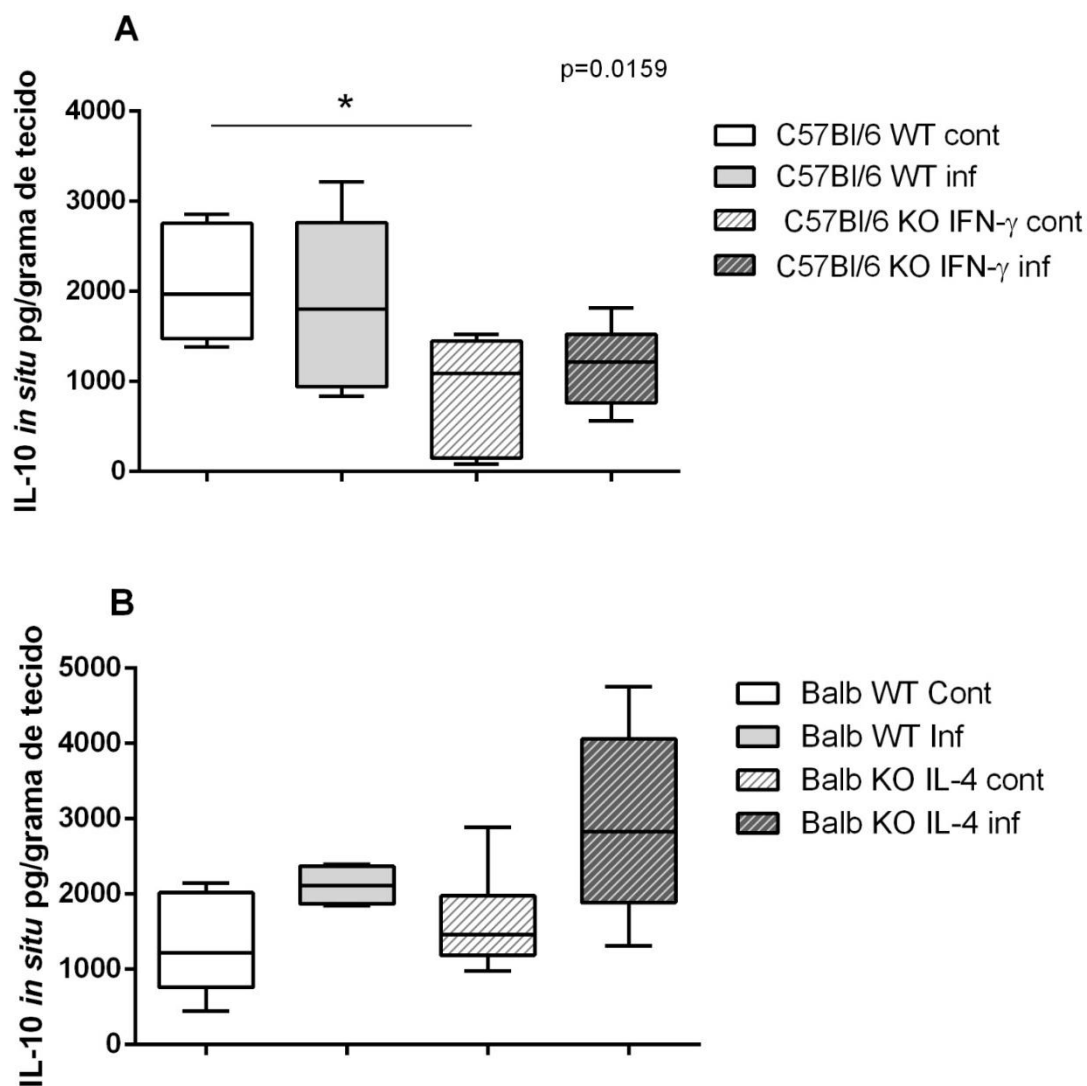


Figura 12 - Expressão de IL-10 em picogramas por grama de coração de camundongos infectados e não infectados pela cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*. **A.** Camundongos C57Bl/6 WT e C57Bl/6 KO IFN- γ ; **B.** Camundongos Balb-c WT e Balb-c KO IL-4. Diferenças estatisticamente significativa estão marcadas com * ($p < 0,05$), teste de Mann-Whitney. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%.

Na dosagem de IL-4, os resultados apresentados não foram representativos, devido a detecção da expressão dessa citocina ter sido baixa.

1.5 Produção sérica de leptina

A análise foi realizada entre os grupos C57Bl/6 WT versus C57Bl/6 KO IFN- γ e Balb-c WT versus Balb-c KO IL-4 infectados e não infectados com a cepa Colombiana.

A produção de leptina foi significativamente maior no grupo C57Bl/6 KO foi infectado apresentou níveis de leptina significativamente maior que C57Bl/6 WT infectado e C57Bl/6 KO controle ($p=0,0062$, $p=0,0377$; Teste t, Figura 13A).

Os animais Balb-c WT infectados apresentaram níveis de leptina significativamente maior em relação ao seu controle. ($p=0.0586$; Teste t, Figura 13B).

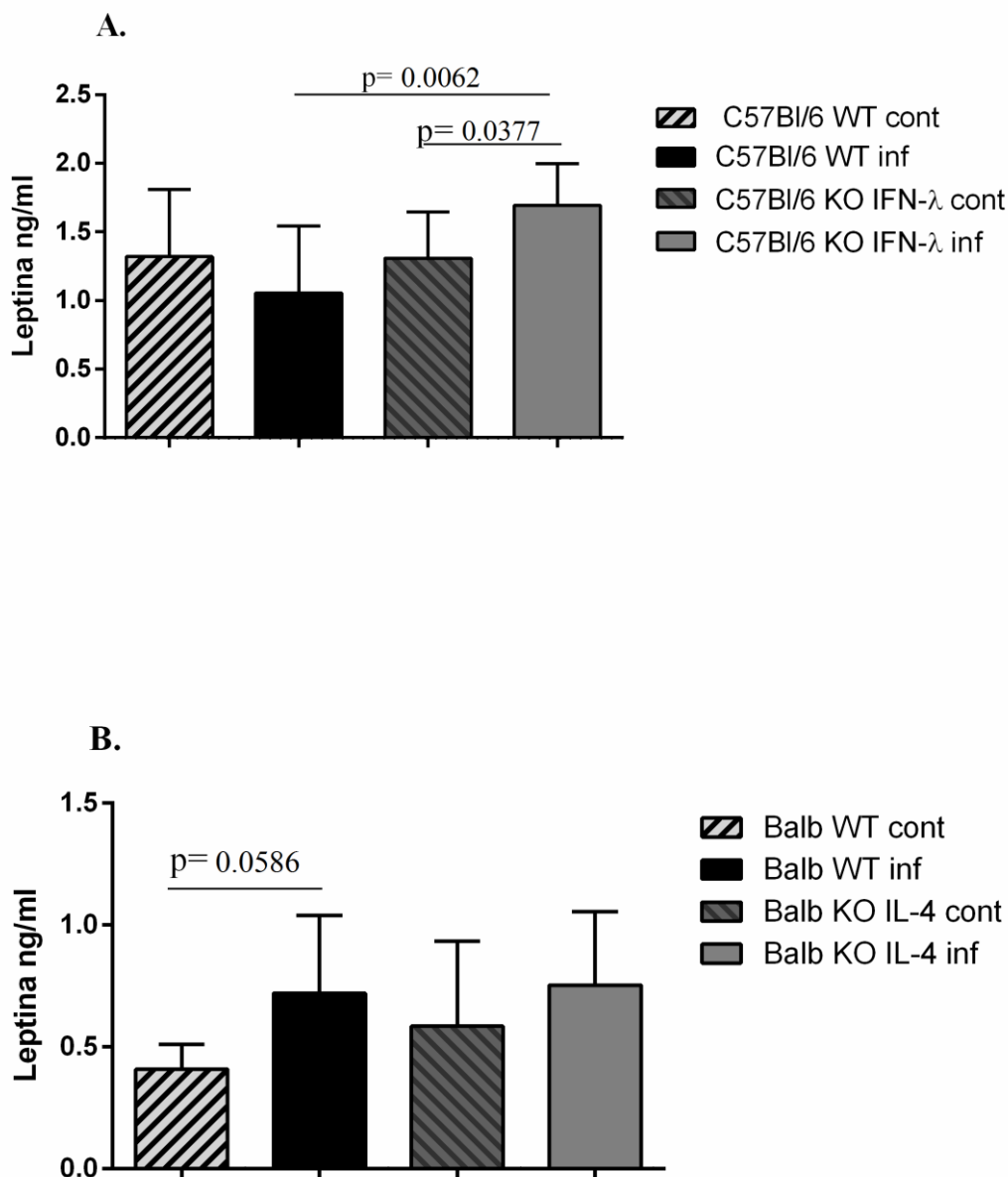


Figura 13 – Níveis séricos de leptina (ng/mL) no soro de camundongos infectados e não infectados com a cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*. **A.** camundongos C57Bl/6 WT versus C57Bl/6 KO IFN- γ . **B.** Balb-c WT e Balb-c KO IL-4. O eixo das ordenadas indica a média das concentrações de cada grupo e o eixo das abscissas representa os diferentes grupos e linhagens de camundongos expressos na legenda. Os resultados foram expressos em Média $\pm$ desvio padrão. * $p<0,05$, Mann Whitney.

1.6 Produção sérica de TNF- α

A análise foi realizada entre os grupos C57Bl/6 WT versus C57Bl/6 KO IFN- γ e Balb-c WT versus Balb-c KO IL-4 infectados e não infectados com a cepa Colombiana.

Não foram observadas diferenças na expressão de TNF- α entre os grupos C57Bl/6 WT versus C57Bl/6 KO IFN- γ . No entanto o grupo Balb-c WT infectado apresentou níveis significativamente maiores de TNF- α sérico quando comparado ao grupo Balb-c KO IL-4 infectados (Figura 14A e 14B) (Mann-Whitney).

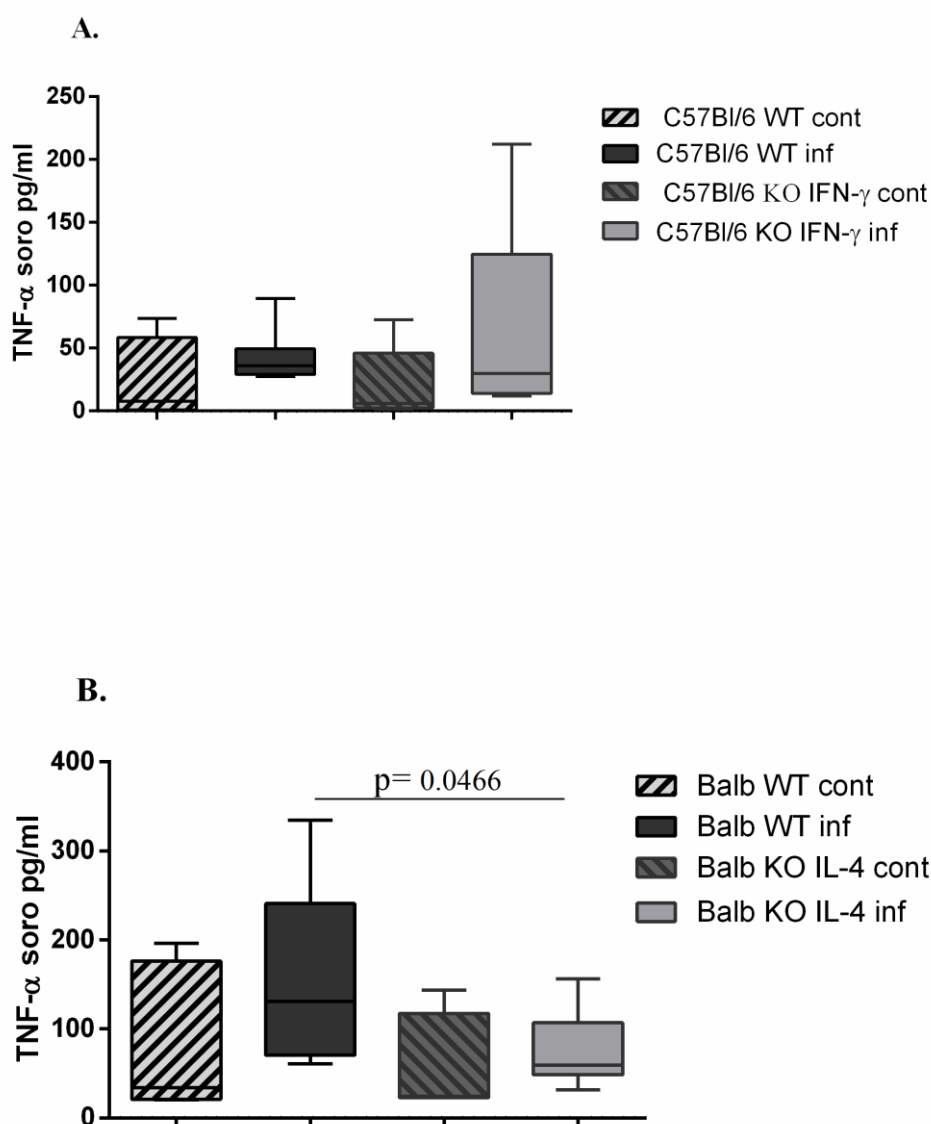


Figura 14 – Níveis séricos de TNF- α (pg/mL) no soro de camundongos infectados e não infectados com a cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*. **A.** camundongos C57Bl/6 WT versus C57Bl/6 KO IFN- γ . **B.** Balb-c WT e Balb-c KO IL-4. Diferenças estatisticamente significativas estão marcadas com * ($p < 0,05$), teste de Mann-Whitney. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%.

1.7 Produção sérica de IL-10

A análise foi realizada entre os grupos C57Bl/6 WT versus C57Bl/6 KO IFN- γ e Balb-c WT versus Balb-c KO IL-4 infectados e não infectados com a cepa Colombiana.

Não foi observada diferença estatística na expressão de IL-10 foi nos grupos C57Bl/6 WT controle e infectados quando comparado ao C57Bl/6 KO IFN- γ controle e infectado. Entre os Balb-c foi observada diferença significativa na expressão de IL-10 entre os Balb WT infectados versus o Balb WT controle ($p=0,0010$; Mann-Whitney) (Figura 15A e 15B).

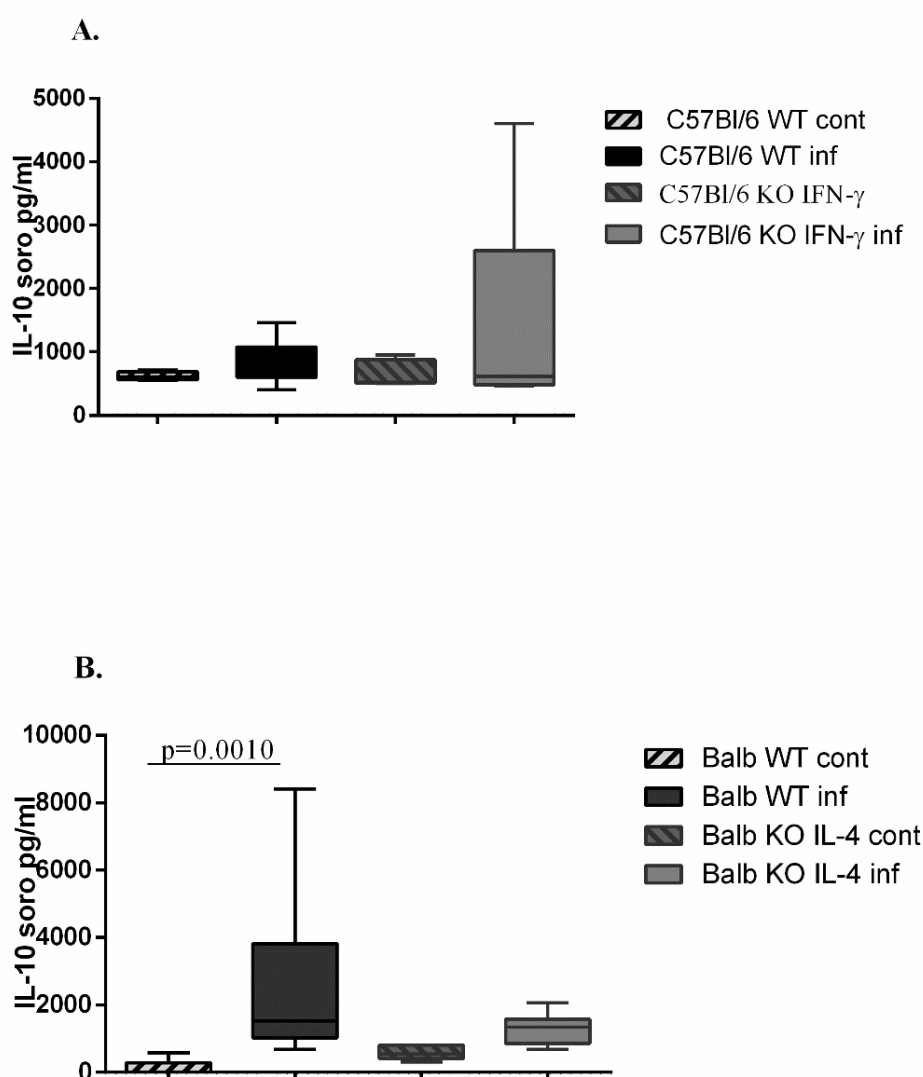
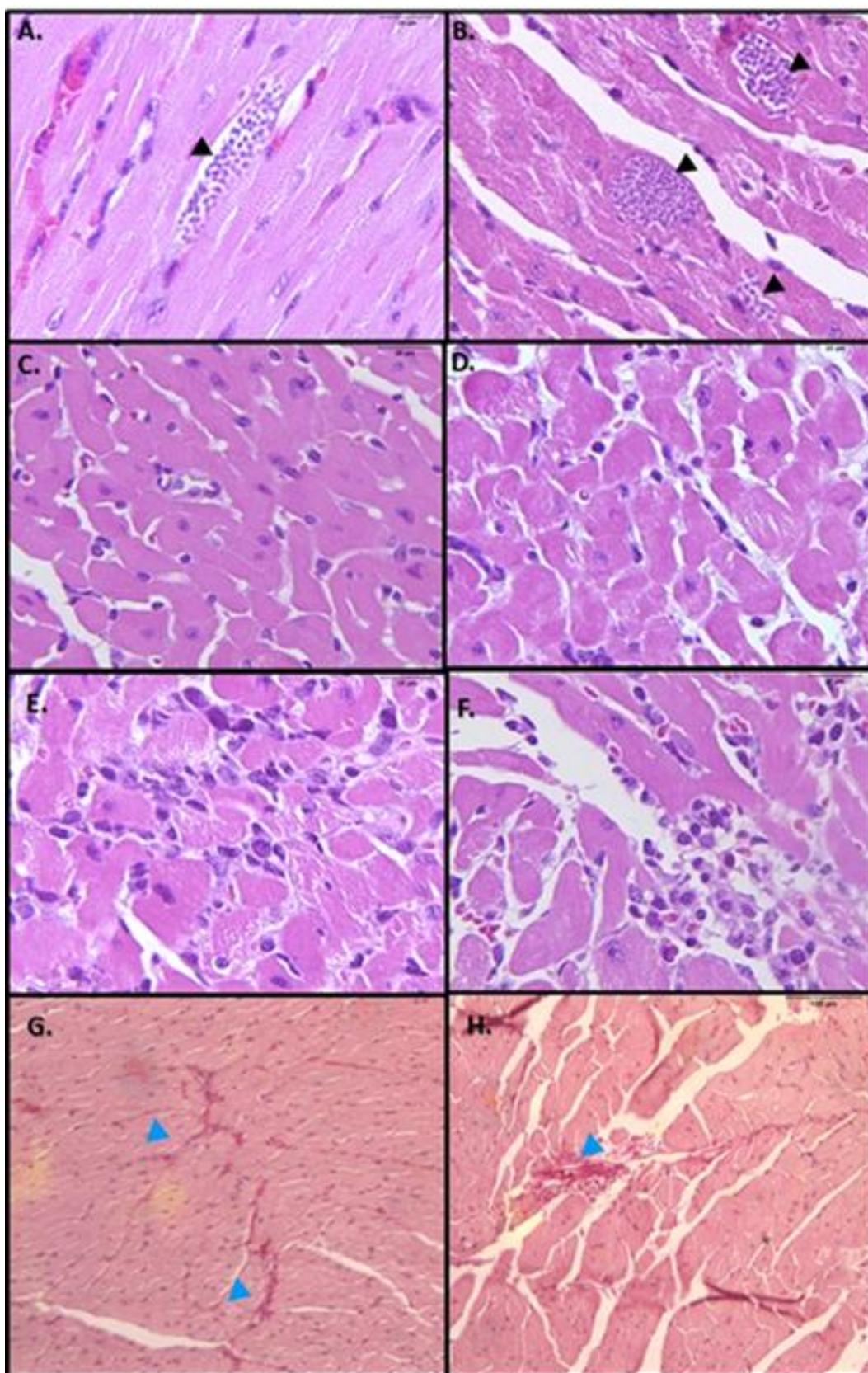


Figura 15 – Níveis séricos de IL-10 (pg/mL) no soro de camundongos infectados e não infectados com a cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*. **A.** camundongos C57Bl/6 WT versus C57Bl/6 KO IFN- γ . **B.** Balb-c WT e Balb-c KO IL-4. Diferenças estatisticamente significativas estão marcadas com * ($p<0,05$), teste de Mann-Whitney. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%.



Prancha 1 – Cortes histológicos de coração de camundongos infectados há 21 dias com 100 formas da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*. Em **A. e B.** Ninhos de amastigotas indicados por pontas de setas pretas em fotomicrografias de lâminas coradas HE. **C. e D.** infiltrado inflamatório discreto (HE). **E. e F.** infiltrado inflamatório moderado (HE). **G e H.** Fibrose, corada em vermelho (Picro-sírius), indicada por pontas de setas azuis.

DISCUSSÃO

No presente trabalho foi estudado o papel de mediadores inflamatórios juntamente com as alterações cardíacas resultantes da infecção experimental com a cepa Colombiana de *T. cruzi* na fase aguda da infecção.

Na doença de Chagas o fator lesivo inicial é o parasitismo de miocardiócitos pelo *T. cruzi*. Nossos resultados demonstram uma maior quantidade de ninhos de amastigotas nos animais C57BL/6 KO IFN- γ , quando comparado com C57BL/6 WT e com Balb-c KO IL-4. Estes resultados indicam a importância do IFN- γ , um fator ativador de macrófagos, na resistência do hospedeiro a infecção pela doença de Chagas aguda e são concordantes com os resultados de outros estudos (MICHAILOWSKY *et al.*, 2001; ROGGERO *et al.*, 2002; BORGES *et al.*, 2009).

No presente estudo o infiltrado inflamatório foi semelhante entre os grupos comparando-se os grupos de camundongos infectados da linhagem C57BL/6 (C57BL/6 WT e C57BL/6 KO IFN- γ) e Balb-c (Balb-c WT e Balb-c KO IL-4), resultados semelhantes foi encontrado por MICHAILOWSKY *et al.* (2001). Por outro lado, alguns estudos demonstram que camundongos C57BL/6 WT são utilizados como modelos de resistência a microorganismo intracelulares, devido sua boa produção de citocinas pró-inflamatória acompanhado de intenso infiltrado inflamatório (HEINZEL *et al.*, 1998).

A análise da fibrose não mostrou diferença entre os grupos controle e infectados, assim como entre os camundongos nocautes para IL-4 e IFN- γ . Tais resultados podem ser explicados, pois a avaliação foi feita na fase aguda da infecção. Acreditamos que no decorrer de mais tempo, esses grupos iriam apresentar diferença na deposição de colágeno (fibrose). A fibrose é o reparo tecidual que procede a destruição tecidual característica da doença de Chagas. Desta forma, seria uma resposta mais tardia, que não é observada nas fases iniciais da doença (LOPES *et al.*, 1991). Acredita-se que a fibrose seja uma consequência mais tardia e esteja associada com a grande deterioração do miocárdio, geralmente progressiva, com redução importante de células cardíacas e diminuição progressiva da função contrátil, por excessiva distensão das células remanescentes. Contudo, o mecanismo preciso que produz essa destruição está ainda sujeito a controvérsias (JORGE & CASTRO, 2000), por isso, a avaliação da fibrose na doença de Chagas experimental é extremamente importante, pois pode trazer informações que corroborem para

compreensão de seus mecanismos.

Na infecção pelo *T. cruzi*, tanto a interação precoce entre as células do hospedeiro e as do parasita e o desenvolvimento de um microambiente adequado de citocinas são aspectos críticos no controle da parasitemia (RODRIGUES *et al.*, 2010).

O TNF- α é uma citocina importante na progressão da cardiopatia chagásica e que contribui para fisiopatologia da infecção pelo *T. cruzi* (MACHADO *et al.*, 2014). Em nossos resultados foi evidenciada uma maior expressão de TNF- α nos grupos e C57Bl/6 KO IFN- γ e Balb-c WT e Balb-c KO IL-4 infectados em comparação aos não infectados. Esses resultados estão de acordo com os já descritos que demonstram uma maior expressão dessa citocina na infecção pelo *T. cruzi*. No entanto, os mecanismos moleculares que conduz a superexpressão TNF- α nesta doença ainda não estão totalmente elucidados, sabe-se que macrófagos infectados pelo *T. cruzi* expressam TNF- α , que são importantes para ativação de células NK (GAZZINELLI *et al.*, 1992; BRENER & GAZZINELLI, 1997; MICHAILOWSKY *et al.*, 2008).

Os macrófagos e as células dendríticas são as células responsáveis pela produção de IL-12p70, uma citocina mediadora fundamental da resposta imune inata, sendo importante para a produção de IFN- γ pelas células NK e linfócitos T (ROGGE *et al.*, 1997). Quando infectados pelo *T. cruzi*, os macrófagos secretam IL-12p70 para a ativação de células NK e linfócitos. O resultado desta ativação é a produção de IFN- γ que irá atuar nos macrófagos, tornando-os aptos na atividade microbicida através da produção de NO (GAZZINELLI *et al.*, 1992). A IL-12p70 em ação conjunta com outras citocinas desencadeiam a diferenciação em células Th1 produtoras de IFN- γ específicas contra o *T. cruzi*. Essas células migram para o sítio da inflamação induzida pelo parasita, incluindo o miocárdio, em resposta a produção local de quimiocinas (TEIXEIRA *et al.*, 2002; MARINO *et al.*, 2004; CUNHA-NETO, 2008).

Na fase aguda da doença de Chagas o IFN- γ é descrito como uma citocina protetora, devido a sua capacidade de ativação do óxido nítrico induzível (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2000; REED, 1988; VESPA *et al.*, 1994). Em nossos resultados, observou-se que os animais infectados foram melhores produtores de IFN- γ do que os não-infectados, corroborando com outros trabalhos de nessa mesma linha (SILVA *et al.*, 1997; MACHADO *et al.*, 2014. Sendo que nesse ultimo os animais infectados com a cepa Colombiana demonstraram aumento do IFN- γ *in situ*.

Ainda, pudemos observar que os animais nocautes para IFN- γ apresentaram maior produção de TNF- α *in situ*, acreditamos que esse pode ser um mecanismo compensatório de resposta inflamatória frente a ausência de IFN- γ .

Em 2014, Cunha-Neto *et al* relatou que em pacientes com ccc o miocárdio exibia de forma significativa o aumento da expressão de mRNA que codifica o IFN- γ e uma expressão reduzida do mRNA para IL-17. A subpopulação de IL-17 é a principal fonte de IL-17, mas essa também pode ser sintetizada por células T CD8⁺, NK e T com TCR $\gamma\delta$. A IL-17 tem um papel protetor ao estimular a produção de IL-1 β e TNF- α por macrófagos (MIYAZAKI *et al.*, 2010).

Nossos dados mostram que houve uma produção significativa de IL-17 pelos Balb-c KO IL-4 não infectado em relação ao Balb-c KO IL-4 infectado. Acreditamos que isso se deva ao fato de que os Balb-c KO IL-4 infectados demonstraram ser bons produtores de IL-10, citocina anti-inflamatória, o que resultaria na diminuição dos níveis de IL-17, citocina pró-inflamatória. Essa hipótese pode ser suportada pelo estudo realizado por Gu *et al* (2008), que demonstra que macrófagos e linfócitos T de camundongos nocautes para IL-10 apresentam aumento da expressão de citocinas do padrão Th17 (IL-17 e IL-22).

Indivíduos com cardiopatia chagásica geralmente tem um déficit em determinados mecanismos que controlam a resposta imune, como na produção de IL-10 (DUTRA *et al.*, 2005). A IL-10 é responsável de forma indireta pela diminuição na síntese de citocinas pró-inflamatórias, controlando a resposta imune e os efeitos potencialmente lesivos dessa ativação sobre os tecidos do hospedeiro (FIORENTINO *et al.*, 1991). Níveis de IL-10 foram determinados para avaliar seu possível papel na regulação da resposta inicial da infecção com *T. cruzi*. Neste sentido, uma maior produção de IL-10 sérica foi observada nos animais Balb-c infectados quando comparados com os não infectados, acreditamos que essa maior produção de IL-10 seja para regular a resposta imune, uma vez que esses animais estão produzindo muito IFN- γ *in situ* e TNF- α sistêmico. Esses dados estão de acordo com o trabalho de ROGGERO *et al.*, 2002, que demonstra que o Balb-c é um bom produtor de citocinas pró-inflamatória (ROGGERO *et al.*, 2002).

Sabe-se hoje que o tecido adiposo é um órgão multifuncional, produtor e secretor de inúmeros peptídeos e proteínas bioativas, denominadas adipocitocinas. E que essas moléculas exercem importantes efeitos sobre a resposta imunológica, como a leptina sobre a resposta Th1 (HALLE & PERSSON, 2002). Nossos resultados

demonstram que os níveis de leptina estão aumentados nos animais C57Bl/6 KO IFN- γ infectado, esse resultado não está de acordo com outros estudos experimentais que notaram diminuição na secreção de leptina frente a infecção pelo *T. cruzi* na fase aguda. Acredita-se que essa diminuição está associada a diminuição da gordura corporal, uma consequência da diminuição da ingestão de alimentos e lipólise associada a infecção (COOMBS *et al.*, 2005; NAGAJYOTHI, 2010; NAGAJYOTHI, 2012). Em nosso estudo acreditamos que o aumento da leptina sérica nos camundongos C57Bl/6 KO IFN- γ infectados parece estar mais associado a ausência de IFN- γ do que com a infecção, pois animais infectados dos outros grupos não apresentaram aumento de leptina. Esse achado poderia indicar um processo de compensação imunológica, uma vez que, a leptina tem função na geração e manutenção da resposta imune frente a um processo infeccioso (FILIPPATOS *et al.*, 2000; SCHULZE *et al.*, 2003).

Nosso resultado da análise sérica do TNF- α demonstrou que não houve diferença na expressão sistêmica dessa citocina por nenhum grupo. Esse resultado difere do encontrado em por Kroll-Palhares (2008) que analisaram os níveis plasmáticos de TNF- α na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* com a cepa colombiana e notaram o aumento da expressão desta citocina, demonstraram também que o TNF- α participa mais não é crucial para o controle da parasitemia.

Assim como os níveis de leptina a expressão de IL-10 sistêmica esteve aumentada nos animais Balb-c WT infectados, sabendo que a leptina promove atividade pró-inflamatória, justifica-se o aumento da IL-10 nesses animais como tentativa de controlar a resposta inflamatória exacerbada (FIORENTINO *et al.*, 1991; FILIPPATOS *et al.*, 2000; SCHULZE *et al.*, 2003)

Na cardiopatia chagásica, o infiltrado inflamatório rico em células mononucleares tem um papel muito importante no seu desenvolvimento e progressão. Sabe-se que os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da cardiopatia chagásica ainda não estão completamente elucidados, dessa forma esse trabalho pode contribuir com melhor entendimento da lesão produzida no miocárdio na fase inicial da doença.

CONCLUSÃO

Nossos resultados apontam que na ausência de IFN- γ os camundongos infectados não conseguem controlar o parasitismo tissular apesar de apresentarem semelhança no infiltrado inflamatório com os demais grupos, com produção aumentada *in situ* de TNF- α , mas não de IL-12, IL-17 e IL-10. De forma importante, os camundongos deficientes de IFN- γ apresentam níveis séricos aumentados de leptina, que pode ter sido produzida como mecanismo compensatório da deficiência de resposta Th1.

A deficiência de IL-4 parece não influenciar diretamente na resposta imune *in situ*, nem tampouco na produção de leptina.

De forma interessante, os animais Balb-c infectados mostraram ser bons produtores de leptina, TNF e IL-10 sérico.

REFERÊNCIAS

- ABEL, L.; RIZZO, V.; B. IANNI. "Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection," **J Autoimmun**, vol. 17, no. 1, pp. 99–107, 2001.
- ABRAHAMSOHN, I. A. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz J Med Biol Res**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 117-121, 1998.
- AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Leptin. **Annu Rev Physiol**, Boston, v. 62, n. 1, p. 413-437, 2000.
- ALIBERTI, J. C. *et al.* Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon- γ -and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Pathol**, v. 158, n. 4, p. 1433-1440, 2001.
- ANDRADE, A., PINTO, S. C., OLIVEIRA, RS., orgs. Animais de Laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: **Editora FIOCRUZ**, 2002.
- ANDRADE, C. M. *et al.* Chagas disease: morbidity profile in an endemic area of Northeastern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, Natal, v. 48, n. 6, p. 706-715,
- ANDRADE, S. G. *et al.* Interstitial dendritic cells of the heart harbor *Trypanosoma cruzi* antigens in experimentally infected dogs: importance for the pathogenesis of chagasic myocarditis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 63, n. 1, p. 64-70, 2000.
- _____; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Rev Soc Bras Med Trop**, Salvador, v. 30, n. 1, p. 27-35, 1997.
- _____; ANDRADE, Z. A. Pathology of prolonged experimental Chagas' disease. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, v. 10, n. 3, p. 180-187, 1967.
- _____; CARVALHO, M.L; FIGUEIRA, R.M. Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Gaz Med Bahia**, v. 70, p. 32-42, 1970.
- ANDRADE, V. *et al.* Aspectos imunológicos da infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos por três diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, n.2, p. 203-211, 1985.
- _____; BRODSKYN, C.; ANDRADE, S. G. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Transact Royal Soc Trop Med Hyg**, v. 77, n. 6, p. 796-799, 1983.
- ARAÚJO, A. F. *et al.* Genetic vaccination against experimental infection with myotropic parasite strains of *Trypanosoma cruzi*. **Mediators Inflamm**, São Paulo, v. 2014, 2014.

ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. Doença de Chagas: Manual para experimentação animal. Rio de Janeiro. **Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz**, p. 366, 2000.

AUGUSTO-PINTO, L. *et al.* Single-nucleotide polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. **Genetics**, v. 164, n. 1, p. 117-126, 2003.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. *et al.* Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14–30 years ago. **J Infect Dis**, v. 182, n. 2, p. 634-638, 2000.

BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World J Exp Med**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2013.

_____ *et al.* Acute *Trypanosoma cruzi* infection: IL-12, IL-18, TNF, sTNFR and NO in *Trypanosoma rangeli*-vaccinated mice. **Vaccine**, p. 1868–1872, 2004.

BARBOSA-FERREIRA, J. M. Dysregulation of autonomic nervous system in Chagas' heart disease is associated with altered adipocytokines levels. **PloS One**, São Paulo, v. 10, n. 7, p. 1-14, 2015.

BERG, A. H.; SCHERER, P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circ Res**, New York, v. 96, n. 9, p. 939-949, 2005.

BERMEJO, D. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase initiates an ROR- γ t–AHR-independent program leading to IL-17 production by activated B cells. **Nat Immunol**, Córdoba, v. 14, n. 5, p. 514-522, 2013.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clin Infect Dis**, Atlanta, v. 49, n. 5, p. e52-e54, 2009

BESTETTI, R. B.; MUCCILLO, G. Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. **Int J Cardiol**, v. 60, n. 2, p. 187-193, 1997.

BOBBERT, P. *et al.* Adiponectin expression in patients with inflammatory cardiomyopathy indicates favourable outcome and inflammation control. **Eur Heart J**, Berlin, v. 32, n. 9, p. 1134-1147, 2011.

BOOM, W. H.; LIANO, D.; ABBAS, A. K. Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes: effects of interleukin 4-and interleukin 2-producing T cell clones on resting B lymphocytes. **J Exp Med**, Boston, v. 167, n. 4, p. 1350-1363, 1988.

BORGES, C. R. *et al.* Papel do óxido nítrico no desenvolvimento de lesões cardíacas na fase aguda da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. **Rev Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v. 42, p. 170-174, 2009.

BRENER, Z; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Inst Arch Alle Immunol**, v. 114, p. 103-110, 1997.

_____. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, v. 4, p. 389-396, 1962.

BRENIÈRE, S. F. *et al.* Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young bolivian patients. **Exp Parasitol**, La Paz, v. 89, n. 3, p. 285-295, 1998.

BRIONES, M. R. *et al.* The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Mol Biochem Parasitol**, São Paulo, v. 104, n. 2, p. 219-232, 1999.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annu Rev Microbiol**, Cambridge, v. 49, n. 1, p. 175-200, 1995

CAMANDAROBA, E. L. *et al.* Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodeme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. **Rev Soc Bras Med Trop**, Salvador, v. 34, n. 2, p. 151-157, 2001.

CAMPBELL, D. A. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. **Int J Parasitol**, v. 33, n. 3, p. 269-279, 2003.

CARDILLO, F. *et al.* Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect Immunol**, v. 64, p. 128-134, 1996.

CARDONI R.L., ANTUÑEZ M. I, IL-12 and IFN- γ production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Immunol Lett**, v. 71, p. 103-109, 2000.

CARRANZA, J. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. **Int J Parasitol**, São Paulo, v. 39, n. 9, p. 963-973, 2009.

CARVALHO, C. M. *et al.* Inducible nitric oxide synthase in heart tissue and nitric oxide in serum of *Trypanosoma cruzi*-infected rhesus monkeys: association with heart injury. **PLoS Negl Trop Dis**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 5, 2012.

CHAGAS, C. Nova espécie morbida do homem, produzida por um *Trypanosoma* (*Trypanosoma cruzi*). **Brazil Médico**. 1909.

CHOWDHURY, D.; LIEBERMAN, J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. **Immunol**, v. 26, p. 389-420, 2008.

COMBS, Terry P. *et al.* The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. **J Biol Chem**, New York, v. 280, n. 25, p. 24085-24094, 2005.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 2007.

CONSIDINE, R. V. *et al.* Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **N Engl J Med**, Philadelphia, v. 334, n. 5, p. 292-295, 1996.

CUNHA, F. Q. *et al.* Repeated induction of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity in murine macrophages. **Eur J Immunol**, v. 23 n. 6, p. 1385-1358, 1993.

CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics. **Med Inflamm**, 2014.

_____. *et al.* Myocardial gene and protein expression profiles after autoimmune injury in Chagas' disease cardiomyopathy. **Autoimmun Rev**, v. 10, n. 3, p. 163-165, 2010.

_____. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. **Ver Inst Med Trop**, vol. 50, n. 2, p.67-74, 2008.

_____; IANNI D.; DRIGO, S. A. TNF gene poly-morphisms are associated with reduced survival in severe Chagas' disease cardiomyopathy patients. **Microb Infect**, v.8, n. 3, p. 598-603, 2006.

_____; DZAU, V. J.; ALLEN P. D. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. **American J Pathol**, v. 167, n. 2, p. 305-313, 2005.

_____. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. **Braz J Med Biol Res**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 133-137, 1998.

_____. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proc Natl Acad Sci**, v. 92 n. 8; p. 3541-3545, 1995.

CUNNINGHAM, D.S; GROGL, M.; KUHN, R. E. Suppression of antibody responses in humans infected with *Trypanosoma cruzi*. Infection **Immunity**, v. 30, p. 496-499, 1980.

D'ÁVILA, D. A *et al.* *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. **Int J Parasitol**, v. 39, p. 963-973, 2009.

DARDALHON, V. *et al.* Interleukin 4 inhibits TGF- β -induced-Foxp3⁺ T cells and generates, in combination with TGF- β , Foxp3⁻ effector T cells that produce interleukins 9 and 10. **Nat Immunol**, Boston, v. 9, n. 12, p. 1347, 2008.

DE FREITAS, J. M. *et al.* Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathog**, Belo Horizonte, v. 2, n. 3, 2006.

Departments of Internal Medicine (Infectious Diseases) and Epidemiology, University of Iowa; and the Department of Veterans Affairs Medical Center, Iowa City, Iowa; and The Departments of Medicine and Pathology, Albert Einstein College of Medicine, New York, , n. 1, p. 706–723, 2004.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: **Editora FIOCRUZ**, v. 486, 1997.

DURANTI, M.; CAMARGO, L.; VICTORA, G. Evidence for T cell help in the IgG response against tandemly repetitive *Trypanosoma cruzi* B13 protein in chronic chagas disease patients. **J Parasitol Res**, v. 2012, 2012.

DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends Parasitol**, 21, 581–587, 2005.

DUZ, A. L. *et al.* The TcI and TcII *Trypanosoma cruzi* experimental infections induce distinct immune responses and cardiac fibrosis in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Ouro Preto, v. 109, n. 8, p. 1005-1013, 2014.

ESPER, L. *et al.* Regulatory effects of IL-18 on cytokine profiles and development of myocarditis during *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect**, Belo Horizonte, v. 16, n. 6, p. 481-490, 2014.

EYERICH, S. *et al.* Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. **J Clin Invest**, London, v. 119, n. 12, p. 3573-3585, 2009.

FEDERICI E.E.; ABELMAN, W.B.; NEVA, F.A. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 13, p. 272-280, 1964.

FERNANDES, F. *et al.* Leptin levels in different forms of Chagas' disease. **Braz J Med Biol Res**, São Paulo, v. 40, n. 12, p. 1631-1636, 2007.

FERREIRA, A. V. *et al.* Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. **Microbes Infect**, Belo Horizonte, v. 13, n. 12, p. 1002-1005, 2011.

FILIPPATOS G.S, *et al.* Leptin serum levels in cachetic heart failure patients. Relationship with tumor necrosis factor-alpha system. **J Cardiol**, v. 76, p. 117–122, 2000.

FIORENTINO, D. F. *et al.* IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J Immunol**. v. 147 n. 11, p. 3815-3822, 1991.

FONSECA, S. G. *et al.* TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Microb Infect**, v. 9 n. 9; p. 1104-1113, 2007.

FREDERICH, R. C. *et al.* Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nature Med**, v. 1, p. 1311–1314, 1995.

FREITAS, J. M. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathog**, Belo Horizonte, v. 2, n. 3, 2006.

GAZZINELLI, R.T.; SHER, A. 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. 3515–3519, 2006.

_____ *et al.* The microbicidal activity of interferon- γ treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L- arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibited by interleukin-10 and transforming growth factor- β . **Eur J Immunol**, v. 22, p. 2501-2506, 1992.

_____ *et al.* The microbicidal activity of interferon treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibited by interleukin-10 and transforming growth factor. **Eur J Immunol**, n. 22, p. 2501–2506, 1992.

GOLDEN, J. M.; TARLETON, R. L. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. **Exp Parasitol**, Athens, v. 72, n. 4, p. 391-402, 1991.

GOLGHER, D.; GAZZINELLI, R.T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. **Autoimmunity**, v. 37, n.5, p. 399-409, 2004.

GERDTS, E. Impact of left ventricular geometry on prognosis in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy (the LIFE study). **Eur J Echo**, v. 9, p.809–815, 2008.

GOSWAMI, R.; KAPLAN, M. H. A brief history of IL-9. **J Immunol**, Indianapolis, v. 186, n. 6, p. 3283-3288, 2011.

GU, Y. *et al.* Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells. **Eur J Immunol**, v. 38, p. 1807–1813, 2008.

GUEDES, P. M. *et al.* IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Negl Trop Dis**, Ribeirão Preto, v. 4, n. 2, p. 604-613, 2010.

GUERREIRO, M. L.; MORAIS, I. R.; ANDRADE, S. G. Immunological response to re-infections with clones of the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi* with different degrees of virulence: influence on pathological features during chronic infection in mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 500–506, 2015.

GUIMARÃES, D. E. *et al.* Adipocytocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Rev Nutr**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 5, p. 549-559, 2007.

GUTIERREZ, F. R. *et al.* The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasit Immunol**, v. 31, 673–685, 2009.

GUZIK, T. J.; MANGALAT, D.; KORBUT, R. Adipocytokines novel link between inflammation. **J Physiol Pharmacol**, Atlanta, v. 4, p. 505-528, 2006.

HALL, B. S. *et al.* Cell-specific activation of nuclear factor-kappaB by the parasite *Trypanosoma cruzi* promotes resistance to intracellular infection. **Mol Biol Cell**, v. 11, n. 1, p. 153-60; 2000.

HALLE, M.; PERSSON, P. B. Role of leptin and leptin receptor in inflammation. **Am J Physiol Reg Int Comp Physiol**, v. 284, n. 3, p. 760–762, 2003.

HAMILTON B.S. *et al.* Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. **Nat Med**, v. 1, p. 953–56, 1995.

HENAO-MARTINEZ, A. F. *et al.* AKT network of genes and impaired myocardial contractility during murine acute Chagasic myocarditis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 92, p. 523-9, 2015.

HEINZEL, F. P.; RERKO, R. M.; HUJER, A. M. Underproduction of interleukin-12 in susceptible mice during progressive *leishmaniasis* is due to decreased CD40 activity. **Cell Immunol**, v.184, n. 2, p. 129-42, 1998.

HIGUCHI, M. L., P. S. GUTIERREZ, V. D. AIELLO. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Pathol Anat Histopathol**, v. 423, n. 3, p. 157–160, 1993.

HOLSCHER, C. *et al.* Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*- infected interleukin 10-deficient mice. **Infect Immun**, v. 68, n. 7, p. 4075-4083, 2000.

_____ *et al.* Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infect Immun**, Freiburg, v. 66, n. 3, p. 1208-1215, 1998.

HUNTER C. A.; SLIFER. T; ARAUJO, F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. **Infect Immun**, v. 64, p. 1961- 1967, 1996.

JORGE, T. C. A.; CASTRO, S. L. Doença de chagas: manual para experimentação animal. Rio de Janeiro: **Editora FIOCRUZ**, 2000.

JOSEFOWICZ, S.Z. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. **Annu J Immunol**, v. 30, p. 531–564 50, 2012.

JUNQUEIRA, C. F. Clone não patogênico de *Trypanosoma cruzi* expressando antígeno tumoral como vetor vacinal contra o câncer. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais. 107 p. Belo Horizonte, 2011.

KIERSZENBAUM, F. Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. **Immunol Med Microbiol**, v. 37, n. 1, p. 1-11, 2003.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J Immunol**, v. 166, n. 7, p. 4596- 603, 2001.

KROLL-PALHARES, K. *et al.* TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF- α blockade. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 4, p. 375-385, 2008.

KUREBAYASHI, Y. *et al.* Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells. **Genes Cells**, Tokyo, v. 18, n. 4, p. 247-265, 2013.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. Parasitologia humana. 11. ed. Rio de Janeiro: **Atheneu**, cap. 11, p. 85-108, 2004.

LAROCCA, T. F. *et al.* Transplantation of adipose tissue mesenchymal stem cells in experimental chronic chagasic cardiopathy. **Arq Bras Cardiol**, Salvador, v. 100, n. 5, p. 460-468, 2013

LAUCELLA, S. A. *et al.* Frequency of interferon-gamma-producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. **J Infect Dis**, v. 189, p. 909–918, 2004.

LEMOS, E. M.; LUZ, Z. M. IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 1, p. 127-131, 1998.

LOLLMAN, B *et al.* Detection and quantification of the Leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues. **Biochem Biophys Res Com**, v. 238, p. 648–652, 1997.

LONNQVIST, F. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. **Nature**, v.1, p. 950-953, 1995.

LOPES, E.; CHAPADEIRO, E. Anatomia patológica da doença de Chagas humana. In: DIAS J, COURA J (eds) Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. **Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, p.67-84, 1997.

_____ *et al.* Pathological anatomy of hearts from asymptomatic Chagas disease patients dying in a violent manner. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 76, n. 2, p. 189-197, 1981.

LOPES, H. F.; EGAN, B. M. Autonomic dysregulation and the metabolic syndrome: pathologic partners in an emerging global pandemic. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, v. 87, n. 4, p. 538-547, 2006.

LUCKHEERAM, R. V *et al.* CD4+T Cells: Differentiation and Functions. **Clin Dev Immunol**, Wuhan, v. 2012, 2012.

LUQUETTI, A. *et al.* Recommendations from a satellite meeting. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 429-432, 1999.

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, 2004.

MACHADO, J. R. *et al.* Immunopathological aspects of experimental *Trypanosoma cruzi* reinfections. **BioMed Res Int**, Uberaba, v. 2014, 2014.

MACHADO, P. *et al.* Mecanismos de resposta imune às infecções: Immune response mechanisms to infections. **An Bras Dermatol**, Salvador, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2012.

MAFFEI, M. J. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob mRNA in obese and weight-reduced subjects. **Nature**, v.1, p. 1155–1161, 1995.

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. 308-318, 1999.

MARINO, A.; DA SILVA, P.; DOS SANTOS, A. *et al.* Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. **Circulation**, v. 110, n. 11, p. 1443–1449, 2004.

MARRACK, P.; KAPPLER, J.; KOTZIN, B. L. Autoimmune disease: why and where it occurs. **Nat Med**, Denver, v. 7, n. 8, p. 899-905, 2001.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, E.; RODRÍGUEZ, C.; GALÁN, M. The lysyl oxidase inhibitor (β -aminopropionitrile) reduces Leptin profibrotic effects and ameliorates cardiovascular remodeling in diet-induced obesity in rats. **J Mol Cell Cardiol**, v. 92, p. 96–104, 2016.

_____ *et al.* Leptin, a mediator of cardiac damage associated with obesity. **Horm Mol Biol Clin Invest**, Madrid, v. 18, n. 1, p. 3-14, 2014.

MARTINS-FILHO, G. GAZZINELLI, AND R. CORREA-OLIVEIRA, Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to aTh1-specific immune response. **Infect Immun**, vl. 71, n. 3, p. 1185–1193, 2003.

MARTINS, G. A. *et al.* CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4+ and CD8+ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microb Infect Inst Pasteur**, v. 6, n. 13, p. 1133–1144, 2004.

MANTOVANI, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, v. 25, p. 677–86, 2004.

MAEYER, E.; DE MAEYER-GUINARD, J. Interferon-gamma. **Curr Opin Immunol**, v. 4, p. 321–326, 1992.

MICHAILOWSKY, V. N. *et al.* Pivotal role of interleukin- 12 and interferon- γ axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Pathol**, v. 159, n. 5, p. 1723–1733, 2001.

_____, *et al.* MURTA, S. M. F.; CARVALHO-OLIVEIRA, L. Interleukin-12 enhances in vivo parasitocidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. **Antimic Agents Chemother**, v. 42, n. 10, p. 2549–2556, 2001.

MILES, M. A. *et al.* Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Transact Royal Soc Trop Med Hyg**, v. 74, n. 2, p. 221–237, 1980.

MILLER, M. A.; MCGOWAN, S. E.; GANTT, K. R. Inducible resistance to oxidant stress in the protozoan *Leishmania chagasi*. **J Biol Chem**, v. 275, n. 43, p. 33883–33889, 2000.

MINER, E. C.; MILLER, W. L. A look between the cardiomyocytes: the extracellular matrix in heart failure. **Mayo Clinic Proc**, Rochester, v. 81, n. 1, p. 71–76, 2006.

MIYAZAKI, Y. *et al.* IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, Saga, v. 185, n.2, p. 1150–1157, 2010.

MORATO, M. J. F.; COLLEY, D. G.; POWELL, M. R. Cytokine profiles during experimental Chagas' disease. **Braz J Med Biol Res**, Belo Horizonte, v. 31, n. 1, p. 123–125, 1998.

MOREL, C. M., AND J. LAZDINS. Chagas disease. **Nat Rev Microbiol**, v. 1, p. 14–15, 2003.

MUNOZ-FERNANDEZ, M. A.; FERNANDEZ, M. A.; FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **J Immunol**, v. 22, n. 2, p. 301–307; 1992.

NAGAJYOTHI, F. *et al.* Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cell Microbiol**, New York, v. 14, n. 5, p. 634-643, 2012.

_____ *et al.* Response of adipose tissue to early infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain). **J Infect Dis**, New York, v. 205, n. 5, p. 830-840, 2012.

NIHEI, J. *et al.* Administration of a nondepleting anti-CD25 monoclonal antibody reduces disease severity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Eur J Microbiol Immunol**, Salvador, v. 4, n. 2, p. 128-137, 2014.

NOLAN, P.M. *et al.* A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis program for gene function studies in the mouse. **Nat Gen**, v. 25, p. 440-443, 2000.

OESTREICH, K. J.; WEINMANN, A. S. T-bet employs diverse regulatory mechanisms to repress transcription. **Trends Immunol**, Seattle, v. 33, n. 2, p. 78-83, 2012.

OUYANG, W.; KOLLS, J. K.; ZHENG, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity**, San Francisco, v. 28, n. 4, p. 454-467, 2008.

PEREIRA, I. R. *et al.* A human type 5 adenovirus-based *Trypanosoma cruzi* therapeutic vaccine re-programs immune response and reverses chronic cardiomyopathy. **PLoS Pathog**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, 2015.

_____ *et al.* A human type 5 adenovirus-based *Trypanosoma cruzi* therapeutic vaccine re-programs immune response and reverses chronic cardiomyopathy. **PLoS Pathog**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, 2015.

_____ *et al.* Severity of chronic experimental Chagas' heart disease parallels tumour necrosis factor and nitric oxide levels in the serum: models of mild and severe disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 3, p. 289-298, 2014.

PISSETTI, C. W. *et al.* Associação entre os níveis plasmáticos de TNF-, IFN-, IL-10, óxido nítrico e os isotipos de IgG específicos nas formas clínicas da doença de Chagas crônica. **Rev Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v. 42, n. 4, p. 425-430, 2009.

PÔÇAS, E. S. *et al.* Synergistic interaction between ouabain and 8-methoxy-3, 9-dihydroxy coumestan, a non-steroidal synthetic inhibitor of Na⁺, K⁺-ATPase. **Life Sci**, v. 81, n. 15, p. 1199-1204, 2007.

ROGGE, L. *et al.* Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. **J Exp Med**, Milan, v. 185, n. 5, p. 825-832, 1997.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lan Infect Dis**, v. 1, p. 92-100, 2001.

Quantikine® ELISA: Mouse IL-4 Immunoassay. Minneapolis: R&D Systems, Inc., 2016. Protocol.

REED S.G. *In vivo* administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **J Immunol**, v. 140, 4342-4347, 1988.

RIBEIRO, A. L. *et al.* Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nat Rev Cardiol**, v. 9, n. 10, p. 576–589, 2012.

ROCHA, M. O.; RIBEIRO, A. L.; TEIXEIRA, M. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. **Front Biosc**, v. 8, p. 44–54, 2003.

RODRIGUES, A. *et al.* IFN- γ plays a unique role in protection against low virulent *Trypanosoma cruzi* strain. **PLoS Neglec Trop Dis**, v. 6, n. 4, 2010.

RODRIGUEZ, C.; RODRIGUEZ-SINOVAS, A.; MARTINEZ-GONZALEZ, J. Lysyl oxidase as a potential therapeutic target. **Drug News Perspec**, v. 21, p. 218-24, 2008.

ROGGE, L. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. **J Exp Med**, v.185, p.825–831, 1997.

ROGGERO, E. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 WT mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. **Clin Exp Immunol.**, v. 128, n. 3, p. 421-428, 2002.

ROMAÑA, C. Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de la forma aguda de la enfermedad de Chagas: La conjuntivitis schizotripanosómica unilateral (hipótesis sobre la puerta de entrada conjuntival de la enfermedad). Mision de Estudios de Patologia Regional Argentina (MEPRA), v. 22, p. 16-25, 1935.

ROWLAND, E. C.; LOZYKOWSKI, M. G.; MCCORMICK, T. S. Differential cardiac histopathology in inbred mouse strains chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Parasitol**, v. 78, n. 6, p. 1059-66, 1992.

RYDÉN, M. *et al.* Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor- α -mediated lipolysis in human fat cells. **J Biol Chem**, Stockholm, v. 277, n. 2, p. 1085-1091, 2002.

SAEFTEL, M. *et al.* Mice deficient in interleukin-4 (IL-4) or IL-4 receptor α have higher resistance to sporozoite infection with *Plasmodium berghei* (ANKA) than do naive wild-type mice. **Infect Immun**, Hamburg, v. 72, n. 1, p. 322-331, 2004.

SATHLER-AVELAR, R. *et al.* Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. **Microbes Infect**, Belo Horizonte, v. 10, n. 2, p. 103-113, 2008.

SAVINO, W. *et al.* Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Cyto Grow Fac Rev**, v. 18, n. 2, p. 107-24; 2007.

SCHELEMPER, B. *et al.* Course of infection and histopathological lesions in mice infected with seventeen *T. cruzi* strains isolated from chronic patients. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 16, p. 23-30, 1983.

SCHMUNIS G.A, YADON Z.E. CHAGAS DISEASE: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Trop**, v. 115, n. 1, p. 14-21, 2010.

SCHULZE, P. C. *et al.* Elevated serum levels of leptin and soluble leptin receptor in patients with advanced chronic heart failure. **Eur J Heart Fail**, Leipzig, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2003.

SILVA, J. S. *et al.* Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J Exp Med**, v. 175, n. 1, p. 169-174, 1992.

_____; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). **J Exp Med**, v. 174, n. 3, p. 539-45, 1991.

SILVA, E. M. *et al.* Caspase-8 activity prevents type 2 cytokine responses and is required for protective T cell-mediated immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 174, p. 6314–6321, 2005.

SILVERIO, J. C. *et al.* CD8⁺ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. **PLoS Pathog**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 4, p. e1002645, 2012.

SOARES, M. B. *et al.* Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. **Am J Pathol**, Salvador, v. 159, n. 2, p. 703-709, 2001.

SOARES, M. B. P. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4. **Am J Pathol**, v. 159, n. 2, 2001.

SOUZA, H. C.; PENTEADO, D. M.; MARTIN-PINGE, M.O bloqueio da síntese do óxido nítrico promove aumento da hipertrofia e da fibrose cardíaca em ratos submetidos a treinamento aeróbio. **Arq Bras Cardiol**, v. 89, n. 2, p. 99–104, 2007.

SOUZA A. P. *et al.* Enzymatic markers of heart lesion in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and submitted to Benznidazole chemotherapy. **Parasitol Res**, v. 86, p. 800-808, 2000.

TALVANI, A. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. **Clin Infect Dis**, v. 38, p. 943-950, 2004.

_____ *et al.* Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN- γ as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microb Infect**, v. 2, p. 851–866, 2000.

TARLETON, R. L. *et al.* Susceptibility of β 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, v. 356, p. 338–340, 1992.

_____. *et al.* *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. I. Evidence for the presence of IL-2 producing cells. **J Immunol**, v. 140, p. 2763-2768, 1988.

TARTAGLIA, L. A. *et al.* Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, Cambridge, v. 83, n. 7, p. 1263-1271, 1995.

THOMPSON-SNIPES, L. *et al.* Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. **J Exp Med**, Palo Alto, v. 173, n. 2, p. 507-510, 1991.

TIBAYRENC, M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. **Adv Parasitol**, v. 36, p. 48–115, 1995,

_____; AYALA, F. J. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: Genetic, taxonomical and epidemiological significance. **Evolution**, v. 42, p.277–292, 1988.

TRINCHIERI, G.; PFLANZ, S.; KASTELEIN, R. A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. **Immunity**, Dardilly, v. 19, n. 5, p. 641-644, 2003.

_____. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. **J Exp Med**, v. 177, p. 1199-1204, 1993.

VESPA, G.N., CUNHA, F.Q., SILVA, J.S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. **Infect Immun**, v. 62, p. 5177-5182, 1994.

VILAR-PEREIRA, G. *et al.* Combination Chemotherapy with Suboptimal Doses of Benznidazole and Pentoxifylline Sustains Partial Reversion of Experimental Chagas' Heart Disease. **Antimicrob Agents Chemother**, Rio de Janeiro, v. 60, n. 7, p. 4297-4309, 2016.

_____; RUIVO, L. A.; LANNES-VIEIRA, J. Behavioural alterations are independent of sickness behaviour in chronic experimental Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 8, p. 1042-1050, 2015.

_____. *et al.* *Trypanosoma cruzi*-induced depressive-like behavior is independent of meningoencephalitis but responsive to parasiticide and TNF-targeted therapeutic interventions. **Brain Behav Immun**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 7, p. 1136-1149, 2012.

VITELLI-AVELAR, D. M.; SATHLER-AVELAR, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; *et al.* Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. **Scand Immunol**, v. 68, n. 5, p. 516–525, 2008.

VIGNALI D. A.; KUCHROO, V.K. IL-12 family cytokines: immunological play-makers. **Nat Immun**, v. 13, p. 722-728, 2012.

VRAY, B. *et al.* Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells. **Glycobiology**, v. 14, p. 647–657, 2004.

WAYNFORTH, H. B.; FLECKNELL, P. A. **Exp Surgical Tech**, London, Academic Press, p.328, 1992.

WHO. Chagas Disease. Available at: neglected.diseases@who.int; 2016. Accessed May 10, 2016.

WHO. Chagas disease: control and elimination (A63/17) [online], http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA63/A63_17-en.pdf, 2010.

WOLK, R. *et al.* Plasma leptin and prognosis in patients with established coronary atherosclerosis. **J Am Coll Cardiol**, Rochester, v. 44, n. 9, p. 1819-1824, 2004.

YAMANE, H.; PAUL, W. E. Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4⁺ T cells toward distinct T-helper cell subsets. **Immunol Rev**, Bethesda, v. 252, n. 1, p. 12-23, 2013.

YANG, K., *et al.* The tumor suppressor Tsc1 enforces quiescence of naive T cells to promote immune homeostasis and function. **Nat Immun**, v. 12, p. 888–897, 2011.
ZEIDAN, A. *et al.* mTOR mediates RhoA-dependent Leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Mol Cell Biochem**, v. 352, p. 99–108, 2011.

ZINGALES, B. *et al.* Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, São Paulo, v. 109, n. 6, p. 828-833, 2014.

_____. *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. 1051–1054, 2009.

_____. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de Chagas? **Rev Biol**, São Paulo, v. 6, p. 44-48, 2011.

_____. *et al.* The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Mol Biochem Parasitol**, v. 104, n. 2, p. 219–232, 1999.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 09 de janeiro de 2015.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE
PENDÊNCIA DO PROTOCOLO Nº. 119/14**

I. IDENTIFICAÇÃO:

1. **Título do projeto:** “Avaliação imunopatológica no coração de camundongos nocautes para IL-4 e IFN-gama infectados com a cepa colombiana de *Trypanossoma cruzi*.”
2. **Pesquisador Responsável:** Juliana Reis Machado e Silva
3. **Unidade/Órgão do pesquisador:** IPSTP- UFG
4. **Pesquisadores Participantes:** Juliana Reis Machado e Silva (Coordenador – participação em todas as etapas do projeto), Marcos Vinícius da Silva (Colaborador – responsável pelas análises estatísticas), Vera Lúcia Lima de Almeida (Mestranda – participação em todas as etapas), Crislaine Aparecida da Silva (Colaborador – responsável pelas técnicas de imuno-histoquímica), Mara Rúbia Nunes Celes (Colaborador – responsável pela infecção, parasitemia e pelas análises hisopatológicas), Liliana Borges de Menezes (LColaborador – médica veterinária responsável e análises hisopatológicas), Patrícia Resende Alo Nagib Loyola (Colaborador – responsável pela infecção, parasitemia e pela dosagem de citocinas), Ruy de Souza Lino Junior (Colaborador – responsável pela cultura e morfometria), Flávia Aparecida de Oliveira (Colaborador – responsável pela morfometria).
5. **Unidade onde será realizado:** Escola de Veterinária e Zootecnia/UFG – Setor de Avicultura
6. **Data de apresentação do protocolo a CEUA:** 03.12.2014
7. **Data de Atendimento das Pendências:** 29/01/2015

II - Parecer da CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou** o projeto acima referido e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Reiteramos a importância deste Parecer Substantiado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em **Março de 2016**.

III - Data da reunião: 08/12/2014

Assinado de forma digital por
RENATA

MAZARO:12343522812

Dados: 2015.02.09 12:22:20

ro e Costa

Coordenadora da CEUA-PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com