

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

Marcelo Eduardo Cardozo

**PAPEL DO RECEPTOR ST2 NO DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA IMUNE E  
PATOGENESE NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL AGUDA POR *Trypanosoma cruzi***

Belo Horizonte

2025

Marcelo Eduardo Cardozo

**PAPEL DO RECEPTOR ST2 NO DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA IMUNE E  
PATOGENESE NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL AGUDA POR *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Parasitologia. Área de concentração: Imunoparasitologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara  
Coorientadora: Prof. Dra. Fabiana Simão Machado

Belo Horizonte

2025

043

Cardozo, Marcelo Eduardo.

Papel do receptor ST2 no desenvolvimento da resposta imune e patogênese na infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / Marcelo Eduardo Cardozo. – 2025.

129 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara. Coorientadora: Prof. Dra. Fabiana Simão Machado.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Doença de Chagas. 3. Imunidade. 4. Doenças do Sistema Imunitário. I. Fujiwara, Ricardo Toshio. II. Machado, Fabiana Simão. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**TÍTULO: "PAPEL DO RECEPTOR ST2 NO DESENVOLVIMENTO DA  
RESPOSTA IMUNE E PATOGÊNESE NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL  
AGUDA POR *Trypanosoma cruzi*"**

**ALUNO: MARCELO EDUARDO CARDOZO**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMUNOPARASITOLOGIA**

**DISSERTAÇÃO: 474/2025/04**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **dez de julho de 2025**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

**André Talvani Pedrosa da Silva**

UFOP

**Guilherme de Paula Costa**

UFOP

**Fabiana Simão Machado** - Coorientadora

UFMG

**Ricardo Toshio Fujiwara** - Orientador

UFMG

Belo Horizonte, 10 de julho de 2025.



**Magistério Superior**, em 10/07/2025, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Andre Talvani Pedrosa da Silva, Usuário Externo**, em 12/07/2025, às 07:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Simão Machado, Professora do Magistério Superior**, em 07/08/2025, às 11:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme de Paula Costa, Usuário Externo**, em 12/08/2025, às 15:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4299831** e o código CRC **E76A2B78**.

---

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus e minha família, pela oportunidade de conhecer pessoas tão especiais nesta jornada!

Agradeço ao departamento e ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia por dar o suporte necessário para o desenvolvimento de tantos trabalhos, sem deixar de lado a formação dos estudantes. À Sibeles e à Sumara, por todo apoio e paciência.

Ao meu orientador, Professor Ricardo Fujiwara, agradeço por me aceitar no laboratório mesmo sem me conhecer. Obrigado pela oportunidade e confiança na execução deste projeto! Obrigado por ser um exemplo para todos os seus alunos e sempre investir com tanto apreço em nossa formação!

À minha co-orientadora, Professora Fabiana Simão Machado, agradeço também por aceitar me coorientar mesmo não me conhecendo, pela confiança, e por todo auxílio na execução e planejamento dos experimentos.

À professora Lilian, por todo o esforço na manutenção do laboratório, todas as dicas em imunologia, todas as palavras de confiança e por sempre acreditar no meu potencial “ele vai defender, e vai defender bem!”.

À professora Luisa Magalhães, obrigado por confiar no meu trabalho e acreditar no meu potencial!

A todos os colegas do LICP, obrigado por me acolherem tão bem! Não importa o infortúnio, sempre havia uma mão estendida para ajudar!

Na minha citometria, Jorge, obrigado por ser essa IL-12, sempre aquecendo o ambiente e me dando o *start* que eu precisava. Taty, obrigado por ser esse poço de CD4+ FOXP3+ IL-10+, salvaguardando sempre que necessário. Bryan, Chiara e Isa, o que eu seria sem vocês? Meu mix de RPMI, enzimas e brefeldina! À Ana Laura, que como uma boa T Helper auxilia todo o laboratório. Às ICs (algumas agora mestrandas) Iza, Ana Rafa, Gabi, Luisa, Getúlio e Sara, que tão competentes, para mim sempre serão pequenas células *naive*!

Agradeço a todos os demais que, de alguma forma, contribuíram para o meu trabalho.

## RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, acomete cerca de 6 milhões de pessoas no mundo todo, principalmente em países endêmicos na América Latina. O parasito induz uma robusta imunopatologia, frequentemente resultando em disfunções cardíacas, hepáticas e intestinais. A modulação da resposta imune é essencial tanto para a sobrevivência do hospedeiro quanto do parasita. A interleucina-33 (IL-33) apresenta efeitos pleiotrópicos durante infecções, podendo ser protetora ou prejudicial. A IL-33 se liga ao receptor supressor de tumorigenicidade 2 (ST2), que é expresso em uma variedade de células, incluindo leucócitos. Neste contexto, este estudo objetivou investigar o papel do receptor ST2 durante a fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*. Para isso, camundongos fêmeas BALB/c, selvagens (WT) e geneticamente deficientes para o receptor ST2 (ST2<sup>-/-</sup>), com idades entre 8 e 10 semanas, foram infectados com 1000 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*. A avaliação parasitológica, imunológica e fisiopatológica foi realizada em distintos momentos da fase aguda da infecção para caracterizar o desenvolvimento de patogêneses. Observou-se que a ausência de ST2 resultou em uma diminuição da parasitemia aos 7 dias pós-infecção (dpi), acompanhada pelo desenvolvimento de miocardite precoce e aumento dos níveis de CK-MB. Com a progressão da infecção (20 dpi), os animais ST2<sup>-/-</sup> apresentaram acúmulo de leucócitos no fígado e intestino, associado a disfunções funcionais nesses órgãos. No coração, observamos alterações degenerativas e comprometimento da função elétrica cardíaca. Na avaliação da resposta imune, identificamos respostas inflamatórias exacerbadas no baço, com o aumento na expressão de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em linfócitos. No tecido cardíaco, constatamos redução da população de macrófagos cardíacos residentes, em detrimento do recrutamento de macrófagos MHC II<sup>+</sup> CCR2<sup>+</sup> e monócitos. Ademais, na deficiência do receptor /ST2, observamos uma potencialização generalizada da expressão de IFN- $\gamma$  por variadas populações celulares, incluindo linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, monócitos, neutrófilos e macrófagos. Conclui-se que o eixo IL-33/ST2 desempenha um papel essencial na regulação da resposta inflamatória e na manutenção da homeostase tecidual durante a infecção aguda por *T. cruzi*. Os dados obtidos neste estudo aprofundam o conhecimento sobre os mecanismos imunopatológicos da doença de Chagas e, conseqüentemente, podem direcionar o desenvolvimento de novas estratégias de controle ou terapêuticas.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas; Resposta imune inata e adquirida; Imunopatologia.

## ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects approximately 6 million people worldwide, mainly in endemic countries in Latin America. The parasite induces a robust immunopathology, frequently resulting in cardiac, hepatic, and intestinal dysfunctions. Modulation of the immune response is essential for both host and parasite survival. Interleukin-33 (IL-33) exhibits pleiotropic effects during infections, potentially acting as either protective or detrimental. IL-33 binds to the suppressor of tumorigenicity 2 (ST2) receptor, which is expressed on a variety of cells, including leukocytes. In this context, this study aimed to investigate the role of the ST2 receptor during the acute phase of experimental *T. cruzi* infection. For that, female BALB/c mice, wild-type (WT) and ST2 receptor genetically deficient (ST2<sup>-/-</sup>) mice, aged between 8 and 10 weeks, were infected with 1000 blood trypomastigotes of *T. cruzi* Y strain. Parasitological, immunological and pathophysiological evaluations were performed at distinct time points during the acute phase of infection to characterize the development of pathogenesis. The absence of ST2 was observed to result in a transient decrease in parasitemia at 7 days post-infection (dpi), accompanied by the development of early myocarditis and increased CK-MB levels. With the progression of infection (20 dpi), ST2<sup>-/-</sup> mice exhibited leukocyte accumulation in the liver and intestine, associated with functional impairment in these organs. In the heart, degenerative changes and impaired cardiac electrical function were observed. Evaluation of the immune response revealed exacerbated inflammatory responses in the spleen, with increased expression of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in lymphocytes. In cardiac tissue, a reduction in the resident cardiac macrophage population was observed, alongside an increased recruitment of MHC II+ CCR2<sup>+</sup> macrophages and monocytes. Furthermore, ST2 deficiency led to a generalized enhancement of IFN- $\gamma$  expression by various cell populations, including CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, monocytes, neutrophils, and macrophages. In conclusion, the IL-33/ST2 axis plays an essential role in regulating the inflammatory response and maintaining tissue homeostasis during acute *T. cruzi* infection. The data obtained in this study contribute to the understanding of the immunopathological mechanisms of Chagas disease and, consequently, may guide the development of new control or therapeutic strategies.

**Keywords:** Chagas disease; Innate and adaptive immune response; Immunopathology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Distribuição mundial de casos da doença de Chagas.	17
<b>Figura 2</b> - Diversidade genética do <i>Trypanosoma cruzi</i> e sua relação com a adaptabilidade a diferentes hospedeiros e ambientes.	19
<b>Figura 3</b> - Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .	20
<b>Figura 4</b> - Curso da infecção pelo <i>T. cruzi</i> e desenvolvimento clínico da doença de Chagas em humanos.	23
<b>Figura 5</b> - Visão geral da resposta imune durante a infecção por <i>T. cruzi</i> .	28
<b>Figura 6</b> - Formação do complexo IL-33/ST2/IL1RAcP e ativação da via IL-33/ST2.	30
<b>Figura 7</b> - IL-33 e sua atividade biológica pleiotrópica.	31
<b>Figura 8</b> - Delineamento experimental.	36
<b>Figura 9</b> - Estratégia de análise de populações linfoides do baço.	45
<b>Figura 10</b> - Estratégia de análise de populações mieloides do baço.	46
<b>Figura 11</b> - Estratégia de análise de populações celulares do coração.	47
<b>Figura 12</b> - O papel do eixo IL-33/ST2 no curso da infecção experimental por <i>T. cruzi</i> .	50
<b>Figura 13</b> - Leucograma de camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	52
<b>Figura 14</b> - Peso de órgãos-alvo em camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	53
<b>Figura 15</b> - Avaliação da inflamação hepática de camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	55
<b>Figura 16</b> - Perfil de atividade celular no fígado de camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	56
<b>Figura 17</b> - Avaliação bioquímica de camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	57
<b>Figura 18</b> - Análise histológica do desenvolvimento de fibrose hepática em camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i>	58
<b>Figura 19</b> - Caracterização da inflamação intestinal de camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	59
<b>Figura 20</b> - Perfil de atividade celular no intestino grosso de camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	60

<b>Figura 21-</b> Avaliação da função intestinal de camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	61
<b>Figura 22-</b> Análise histológica cardíaca de camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	63
<b>Figura 23-</b> Níveis séricos de CK-MB em camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	64
<b>Figura 24 -</b> Análise histológica do desenvolvimento de fibrose cardíaca em camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	65
<b>Figura 25 -</b> Avaliação da atividade elétrica de camundongos BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	66
<b>Figura 26 -</b> Análise dos clusters de linfócitos T no baço por citometria de fluxo de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	68
<b>Figura 27-</b> Perfil dos clusters de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> no baço por citometria de fluxo de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	70
<b>Figura 28 -</b> Análise das populações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> presentes no tecido esplênico de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	71
<b>Figura 29-</b> Análise dos clusters de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> no baço por citometria de fluxo de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	73
<b>Figura 30-</b> Perfil das populações de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> presentes no tecido esplênico de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	74
<b>Figura 31-</b> Populações de monócitos Ly6C <sup>low</sup> presentes no tecido esplênico de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	76
<b>Figura 32-</b> Análise das populações de monócitos Ly6C <sup>high</sup> presentes no tecido esplênico de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	77
<b>Figura 33-</b> Perfil das populações de neutrófilos presentes no tecido esplênico de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	78
<b>Figura 34-</b> Análises dos clusters do painel celular no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	80
<b>Figura 35-</b> Análise dos clusters do painel linfoide no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	81
<b>Figura 36-</b> Populações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	83
<b>Figura 37-</b> Populações de linfócitos T regulatórios presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	83

<b>Figura 38-</b> Populações de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	85
<b>Figura 39-</b> Populações de linfócitos $\gamma\delta^+$ CD4 <sup>+</sup> presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	86
<b>Figura 40-</b> Populações de linfócitos $\gamma\delta^+$ CD8 <sup>+</sup> presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	87
<b>Figura 41-</b> Populações de linfócitos $\gamma\delta^+$ DN presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	89
<b>Figura 42-</b> Análise de clusters de macrófagos cardíacos identificados por citometria de fluxo de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	92
<b>Figura 43-</b> Populações de macrófagos cardíacos MHC II- CCR2- presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	93
<b>Figura 44-</b> Populações de macrófagos cardíacos MHC II+ CCR2- presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	94
<b>Figura 45-</b> Populações de macrófagos cardíacos MHC II- CCR2+ presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	95
<b>Figura 46-</b> Populações de macrófagos cardíacos MHC II+ CCR2+ presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	96
<b>Figura 47-</b> Populações de monócitos presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	98
<b>Figura 48-</b> Populações de monócitos Ly6C <sup>high</sup> presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	99
<b>Figura 49-</b> Populações de neutrófilos presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	101
<b>Figura 50-</b> Análise integrada da resposta imune e do dano cardíaco em camundongos deficientes para ST2 infectados com <i>T. cruzi</i> .	103

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Análise histológica semiquantitativa do coração de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	40
<b>Tabela 2</b> - Análise histológica semiquantitativa do fígado de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	40
<b>Tabela 3</b> - Análise histológica semiquantitativa do intestino grosso de animais BALB/c e ST2 <sup>-/-</sup> , infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – Micrograma

µl – Microlitro

° C – Graus Celsius

ALT – Alanina aminotransferase

ANOVA – Análise de variância

APC – Célula apresentadora de antígeno

AST – Aspartato aminotransferase

BSA – Albumina de soro bovino

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animal

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

DAMPS – Padrões moleculares associados à danos

D.O. – Densidade óptica

DPI – Dias pós-infecção

DTNs – Doenças tropicais negligenciadas

DTU- Unidades Discretas de Tipagem

EPO – Peroxidase de eosinófilos

HE – Hematoxilina e eosina

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IFN-γ – Interferon gama

IκB – Inibidor de κB

IL – Interleucina

ILC – Célula linfoide inata

IL-1RAcP- Proteína acessória do receptor de interleucina 1

IFN- Interferon

KO – Knockout

LICP – Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

MFI – Intensidade média de fluorescência

IMFI – Intensidade média de fluorescência Integrada

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

mg – Miligrama

ml – Mililitro

MPO – Mieloperoxidase de neutrófilos

MyD88- Fator de diferenciação mielóide 88

NAG – N-acetilglicosaminidase de macrófagos

NF- $\kappa$ B – Fator nuclear kappa B

Ni – Grupo de animais não infectados

NK – Células natural killer

nm - Nanômetro

PAMPS – Padrões moleculares associados à patógenos

PBMC – Células mononucleadas no sangue periférico

PBS – Tampão fosfato-salino

PCA – Análise de componentes principais

RPM – Rotações por minuto

ST2- Receptor de supressão de tumorigenicidade 2

sST2- Receptor solúvel de supressão de tumorigenicidade 2

ST2L- Receptor ligante de supressão de tumorigenicidade 2

T.A. – Temperatura ambiente

Tc – Grupo de animais infectados

TGF- $\beta$  – Fator de crescimento transformador beta

Th – Células T auxiliares

TLR – Receptores inatos do tipo toll

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

Treg – Células T reguladoras

TSLP – Linfopoiatina estromal tímica

t-SNE – Incorporação Estocástica de Vizinhança Distribuída

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UI – Unidade internacional

WHO – Organização Mundial da Saúde

WT – Wild type (camundongo selvagem)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	17
1.1	Epidemiologia da doença de Chagas	17
1.2	Transmissão da DC e biologia do <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.3	Diagnóstico da DC	21
1.4	Tratamento etiológico	21
1.5	Aspectos clínicos	23
1.6	Modelo experimental e cepa Y	25
1.7	Imunidade e patogênese da DC	26
1.8	Imunobiologia do eixo IL-33/ST2	29
1.9	O papel do eixo IL-33/ST2 em infecções parasitárias	32
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	34
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	35
3.1	Objetivo geral	35
3.2	Objetivos específicos	35
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	36
4.1	Manutenção das cepas e obtenção dos parasitos	36
4.2	Considerações éticas, animais e delineamento experimental	36
4.3	Determinação da parasitemia	37
4.4	Avaliação do perfil hematológico	37
4.5	Escore clínico	37
4.6	Eutanásia	37
4.7	Dosagens bioquímicas hepáticas	37
4.8	Avaliação da atividade celular nos tecidos	38
	4.8.1 Determinação de N-acetilglicosaminidase (NAG)	38
	4.8.2 Determinação de Peroxidase Eosinofílica (EPO)	38
	4.8.3 Determinação de Mieloperoxidase (MPO)	39
4.9	Análise histopatológica	39
4.10	Avaliação da função intestinal	41
4.11	Dosagem de Creatina Quinase miocárdica (CK-MB)	41
4.12	Avaliação da função cardíaca	41
4.13	Citometria de fluxo do baço	42

4.14	Citometria de fluxo do coração .....	43
4.15	Análise e Processamento dos Dados de Citometria de Fluxo .....	44
4.6	Análise estatística .....	47
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
5.1	O eixo IL-33/ST2 no curso da infecção experimental por <i>T. cruzi</i> .....	49
5.2	Perfil da resposta imune celular sistêmica induzida pela infecção por <i>T. cruzi</i> em camundongos Balb/c WT e ST2 <sup>-/-</sup> .....	51
5.3	O eixo IL-33/ST2 regula o desenvolvimento de hepatoesplenomegalia durante a fase aguda da infecção por <i>T. cruzi</i> .....	52
5.4	O eixo IL-33/ST2 na regulação do perfil inflamatório hepático durante a infecção por <i>T. cruzi</i> .....	54
5.5	A deficiência no receptor ST2 prejudica a função hepática em camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> .....	56
5.6	O eixo IL-33/ST2 regula o desenvolvimento de fibrose hepática em camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> .....	57
5.7	A deficiência no receptor ST2 potencializa a inflamação intestinal em camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> .....	58
5.8	Camundongos ST2 <sup>-/-</sup> apresentam alterações na função intestinal e parâmetros fecais durante a infecção aguda por <i>T. cruzi</i> .....	60
5.9	A ausência do receptor ST2 induz miocardite precoce na infecção experimental por <i>T. cruzi</i> em camundongos BALB/c .....	61
5.10	A deficiência no receptor ST2 potencializa o dano cardíaco agudo causado pela infecção por <i>T. cruzi</i> em camundongos BALB/c .....	64
5.11	O eixo IL-33/ST2 regula o desenvolvimento de fibrose cardíaca durante a infecção por <i>T. cruzi</i> em camundongos BALB/c .....	64
5.12	Animais sem o receptor ST2 apresentam piora na função cardíaca durante a infecção aguda por <i>T. cruzi</i> .....	65
5.13	A deficiência no receptor ST2 modula o perfil inflamatório de linfócitos T durante a fase aguda da infecção por <i>T. cruzi</i> .....	67
5.14	O eixo IL-33/ST2 altera a dinâmica de monócitos durante a fase aguda da infecção por <i>T. cruzi</i> .....	75
5.15	Análise de neutrófilos no tecido esplênico na fase aguda da infecção por <i>T. cruzi</i> .....	78
5.16	A ausência do receptor ST2 altera o perfil de células inflamatórias no coração	

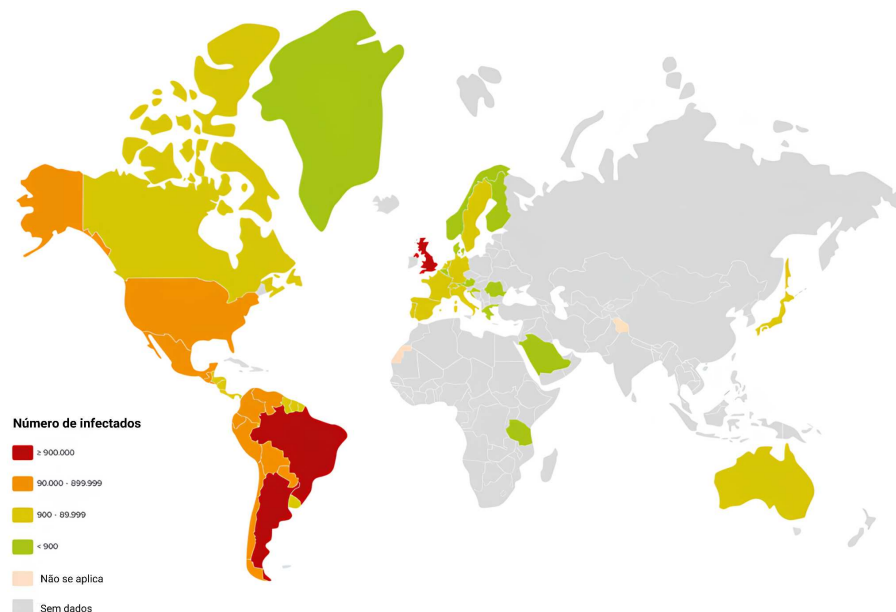
durante a fase aguda da infecção por <i>T. cruzi</i> .....	79
5.17 A infecção aguda por <i>T. cruzi</i> altera a dinâmica das populações linfoides T $\gamma\delta^+$ no coração .....	85
5.18 A deficiência no receptor ST2 altera o perfil de macrófagos cardíacos durante a infecção aguda por <i>T. cruzi</i> .....	90
5.19 A deficiência no receptor ST2 induz o recrutamento de monócitos no tecido cardíaco durante a infecção aguda por <i>T. cruzi</i> .....	97
5.20 A ausência do receptor ST2 induz a ativação de neutrófilos durante a infecção aguda por <i>T. cruzi</i> .....	100
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>104</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>112</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>113</b>
<b>9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO .....</b>	<b>127</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Epidemiologia da doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), ou tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), cujo ciclo de vida envolve insetos vetores triatomíneos e hospedeiros mamíferos. O parasito foi primeiramente identificado por Carlos Chagas em 1909, que também descreveu seu ciclo de vida, hospedeiros invertebrados e vetores, os hospedeiros vertebrados reservatórios e as características clínicas da doença (Chagas, 1909).

Atualmente, estima-se a existência de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo com DC, sendo considerada endêmica em 21 países da América do Sul, Central e partes da América do Norte, incluindo o México e alguns estados do sul dos EUA, como o Texas. Além disso, a doença está presente em países da Europa e do pacífico ocidental (Cucunubá et al., 2024; Palacios Gil-Antuñano et al., 2024; WHO, 2024). (Figura 1).



**Figura 1. Distribuição mundial de casos da doença de Chagas.** A América Latina é a região mais acometida por esta doença, com 21 países endêmicos. Devido ao fluxo migratório, registram-se casos nos Estados Unidos, Canadá e regiões da Europa e Ásia.

Figura Adaptada de: Palacios Gil-Antuñano et al., 2024.

A DC afeta principalmente indivíduos carentes devido à manutenção da transmissão da infecção por *T. cruzi* em áreas rurais onde as populações humanas vivem em habitações mal construídas e em contato próximo com potenciais vetores (Hidron et al., 2010). O fluxo migratório internacional mudou a epidemiologia da doença de Chagas, que atualmente afeta

áreas periurbanas e áreas urbanas, tanto endêmicas quanto não endêmicas (WHO, 2024). Devido ao constante fluxo de imigrantes oriundos de países onde a doença é endêmica, a DC está se tornando um significativo problema de saúde na América do Norte e em muitas partes da Europa, Japão e Austrália, onde um número crescente de indivíduos está infectado. Aproximadamente 300.000 indivíduos que vivem nos EUA têm infecção por *T. cruzi* e cerca de 60.000 na Espanha (Bern; Montgomery, 2009; Hidron et al., 2010; Rassi; Rassi; Marin-Neto, 2010).

Em 2020, o Ministério da Saúde definiu a fase crônica da DC como doença de notificação compulsória em âmbito nacional, disponibilizando o formulário na plataforma e-SUS Notifica para o registro de casos confirmados de doença de Chagas Crônica (DCC) (Brasil, 2023). Sem dúvida, essa medida será de grande valia para o entendimento da epidemiologia da DCC no Brasil.

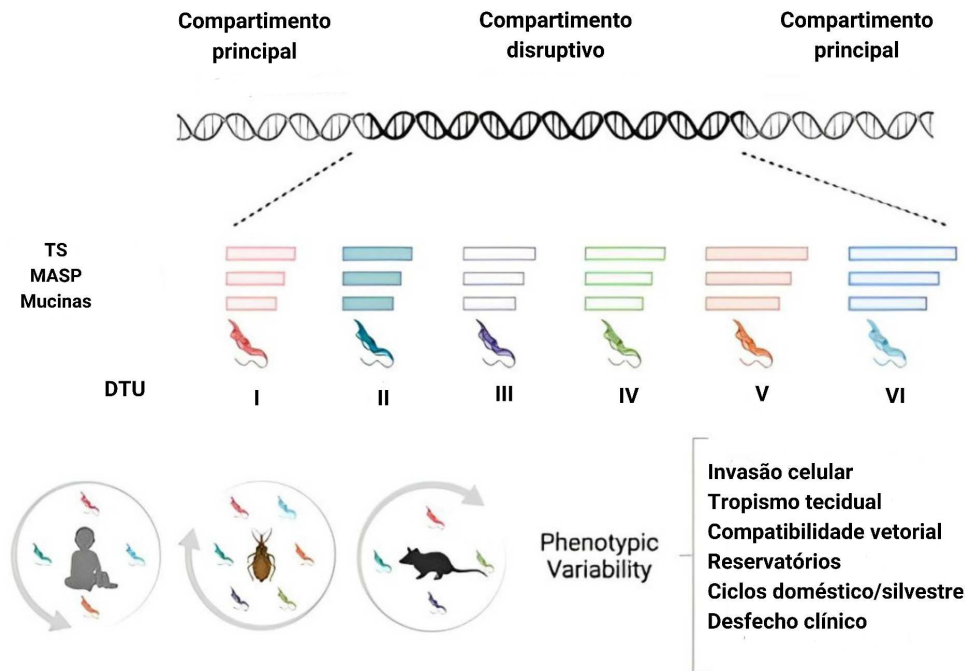
## **1.2 Transmissão da DC e biologia do *Trypanosoma cruzi***

Os vetores da DC são os insetos triatomíneos, popularmente conhecidos como barbeiros (Hemiptera, Reduviidae). Durante o repasto sanguíneo, as formas tripomastigotas metacíclicas, localizadas na extremidade distal do tubo digestório dos insetos, são eliminadas com as fezes e/ou urina e penetram no organismo do hospedeiro através de pele lesada ou mucosa (Dias; Schofield, 1999). Embora existam cerca de 140 espécies de triatomíneos, algumas delas, como *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, e *Rhodnius prolixus* são reconhecidas como os principais vetores da DC envolvidos na transmissão humana (Rassi; Rassi; Marin-Neto, 2010).

Devido às políticas de controle de vetores iniciadas na década de 1970, o número de mortes anuais diminuiu em aproximadamente 50% após 1990. Este sucesso deve-se principalmente aos esforços regionais para a interrupção da transmissão do *T. cruzi* pelo principal vetor domiciliado (*Triatoma infestans*) em três países endêmicos (Uruguai em 1997, Chile em 1999 e Brasil em 2006). Contudo, mais de 70 milhões de pessoas permanecem em risco em países da América Latina (OPAS, 2023).

Além da transmissão vetorial, outras formas de transmissão da DC incluem transfusão sanguínea, via oral, congênita, acidentes de laboratório e transplantes de órgãos (Lidani et al., 2019; Pérez-Molina; Molina, 2018; Prata, 2001). A transmissão oral da doença tornou-se uma prioridade de saúde pública em algumas regiões, com numerosos surtos registrados no Brasil, Venezuela, Colômbia, e Guiana Francesa (Franco-Paredes et al., 2020).

Existem 7 grupos de *T. cruzi* classificados em DTUs (do inglês, *discrete typing units*): Tc I-VI e Tcbat, definidas com base em marcadores biológicos, bioquímicos, e genéticos (Zingales et al., 2009, 2012, 2018). As DTUs diferem quanto às suas associações ecoepidemiológicas, variações genéticas, reservatórios (mais de 100 espécies de mamíferos) e vetores (Magalhães et al., 2022; Zingales; Bartholomeu, 2022) (Figura 2).

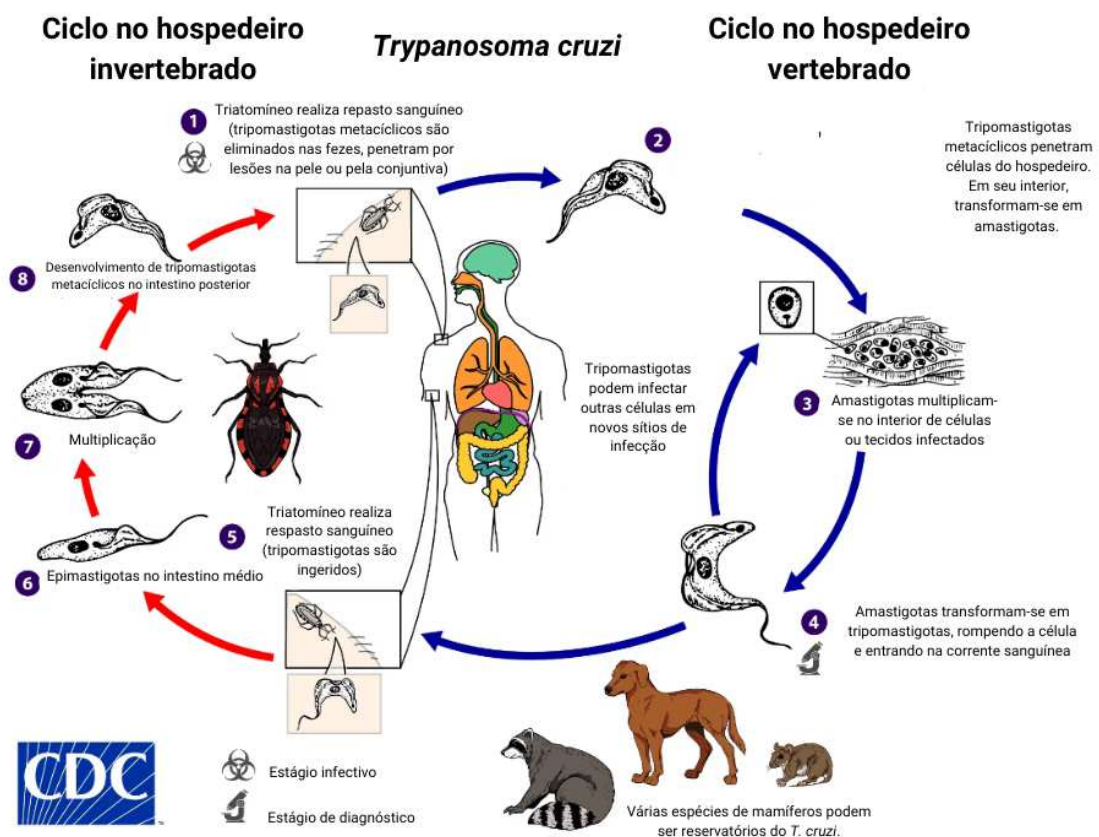


**Figura 2. Diversidade genética do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com a adaptabilidade a diferentes hospedeiros e ambientes.** As DTUs variam conforme polimorfismo em compartimentos principais ou disruptivos, conferindo um fenótipo particular de cada grupo. A diversidade genética do parasito tem impacto em fatores como tropismo tecidual, associação com reservatórios e vetores, e desfecho clínico da doença. Figura adaptada de: Zingales; Bartholomeu, 2022.

A transmissão vetorial envolve a invasão celular no hospedeiro mamífero por formas infecciosas para mamíferos (as formas tripomastigotas metacíclicas). Qualquer célula nucleada pode ser infectada pelo *T. cruzi*, que se diferencia em formas amastigotas replicativas e, posteriormente, em formas tripomastigotas, altamente infectantes (Rassi; Rassi; Marin-Neto, 2010). Os tripomastigotas lisam as células, invadem tecidos e se espalham através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea para locais distantes. O ciclo tem continuidade pela ingestão, pelo vetor, de sangue contendo formas tripomastigotas sanguíneas (Hidron et al., 2010).

Após a ingestão do parasito, estes migram para o intestino médio do inseto, onde uma pequena parcela de parasitos remanescentes se diferenciam em formas epimastigotas replicativas (Castro et al., 2007). Os epimastigotas reproduzem-se por fissão binária e

colonizam o intestino médio e posterior do inseto (Nogueira et al., 2007). Na porção distal do tubo digestório, os epimastigotas aderem-se às células epiteliais e inicia-se o processo de metaciclogênese, com a diferenciação em tripomastigotas metacíclicas. Entre os estímulos envolvidos com a metaciclogênese, estão a queda de pH (abaixo de 5,5) e estresse metabólico (Alves et al., 2007). Os triatomíneos defecam durante ou após o repasto sanguíneo, depositando fezes e/ou urina sobre a pele do mamífero do qual se alimentam. A infecção em um novo hospedeiro ocorre após a invasão de tripomastigotas metacíclicas na pele lesada ou mucosas (Figura 3).



**Figura 3: Ciclo de vida do *T. cruzi*.** (1) As formas tripomastigotas metacíclicas são eliminadas junto dos excrementos do inseto vetor e ao contato com feridas ou mucosas, podem invadir o hospedeiro vertebrado. (2) No interior do organismo, as formas tripomastigotas têm a capacidade de invadir as células nucleadas e se diferenciar na forma replicativa amastigota. (3) Posteriormente, as formas amastigotas passam a se replicar no interior das células hospedeiras, formando ninhos de amastigotas. (4) Eventualmente, as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que rompem a célula parasitada e podem se disseminar para outros tecidos. (5) Alternativamente, os tripomastigotas podem ser ingeridos pelo inseto hematófago no momento do repasto sanguíneo. (6) No intestino médio do inseto, os tripomastigotas ingeridos se diferenciam em epimastigotas, que são as formas que colonizam o seu tubo digestivo. (7) No intestino posterior do inseto, as formas epimastigota originam as formas tripomastigotas metacíclicas, altamente infecciosas. Ao entrar em contato com organismos mamíferos, podem iniciar novas infecções, dando continuidade ao ciclo. Figura adaptada de: CDC, 2024.

### **1.3 Diagnóstico da DC**

Atualmente, apenas 7% das pessoas com DC são diagnosticadas, e somente 1% recebe tratamento etiológico adequado no século XXI (Chaves et al., 2017). O diagnóstico da DC é desafiador, sendo apoiado por informações epidemiológicas e pelas manifestações clínicas. O diagnóstico precoce é crucial para prevenir o desenvolvimento e progressão da cardiomiopatia chagásica.

O diagnóstico na fase aguda depende da visualização de formas tripomastigotas sanguíneas em esfregaços sanguíneos ou a observação do parasito em exames a fresco. Com a progressão da infecção aguda, a parasitemia diminui drasticamente, tornando a observação do parasito extremamente difícil (Dias et al., 1997). Outras formas de diagnóstico nesta fase são hemocultura (por meio de cultura específico) ou xenodiagnóstico (que envolve a detecção do parasito nas excretas de triatomíneos alimentados com o sangue de pacientes). Embora apresentem alta sensibilidade na fase aguda, essas duas metodologias são raramente executadas, devido à necessidade de equipamento e pessoal qualificado, e sua baixa sensibilidade na fase crônica da infecção. Além disso, demandam um longo período (30-180 dias) até a obtenção de resultados definitivos (Galvão et al., 1993). Embora haja testes sorológicos disponíveis para o diagnóstico baseados na detecção de IgM, seu desempenho ainda é questionável. Na fase aguda, a pesquisa de anticorpos específicos da classe IgG é raramente positiva (Gomes et al., 2009).

Na fase crônica, o diagnóstico baseia-se na detecção de IgG, por meio de testes como Ensaio Imunoenzimático (ELISA), Imunofluorescência indireta (RIFI), ou hemaglutinação indireta (HAI). A confirmação da DC ocorre pela soropositividade em pelo menos dois testes sorológicos distintos (Dias et al., 2016; WHO, 2002). Nos últimos anos, o diagnóstico molecular tem ganhado visibilidade, possibilitando detectar DNA do parasito no sangue ou em tecidos com variável sensibilidade (50 a 90%), contudo, ainda existe pouca padronização entre os laboratórios de rotina para a execução destes testes, além de sua alta complexidade (Schijman et al., 2011).

### **1.4 Tratamento etiológico**

Desde 1970, existem apenas dois fármacos tripanocidas aprovados para o tratamento da DC, o benzonidazol (BZN) e nifurtimox (NFX) (Bern et al., 2007). No Brasil, apenas o BZN é aprovado para uso, devido à maior quantidade de estudos demonstrando sua relativa eficácia e segurança (Sangenito et al., 2019). Este fármaco atua no metabolismo redox do protozoário, interferindo com a síntese de DNA e tornando-o mais suscetível à dano oxidativo

(Galván, Losada et al., 2021). No entanto, o BZN tem baixa eficácia na fase crônica da infecção, além da presença de cepas resistentes (Dias et al., 2016; Pérez-Molina; Molina, 2018). Entre as reações adversas, podem-se observar dermatite alérgica (20-30% dos pacientes), neuropatias (5-10% dos pacientes). Efeitos adversos incomuns incluem náuseas, vômitos, anorexia, perda de peso, leucopenia e trombocitopenia (Jackson; Wyssa; Chappuis, 2020).

Já para o NFX, os efeitos adversos incluem distúrbios gastrointestinais em 30-70% dos pacientes, assim como toxicidade ao sistema nervoso central e periférico (Jackson et al., 2010; Jackson; Wyssa; Chappuis, 2020). É importante ressaltar que o esquema de tratamento é prolongado, durando 60 dias, ao longo dos quais os efeitos adversos podem se manifestar.

No Brasil, o tratamento é indicado para os casos pediátricos, agudos, congênitos, em casos de reativação da infecção e em indivíduos com forma crônica menores de 18 anos de idade (de Andrade et al., 1996; Rassi; Rassi; Marin-Neto, 2010). O tratamento de pacientes adultos assintomáticos pode ser recomendado, principalmente devido evidências na redução da progressão da cardiomiopatia após o tratamento (Fabbro et al., 2007; Viotti et al., 2006). O tratamento etiológico, mesmo em pacientes com cardiomiopatia, parece ser benéfico, com diminuição do acometimento cardíaco e da mortalidade (Cardoso et al., 2018; Morillo et al., 2015).

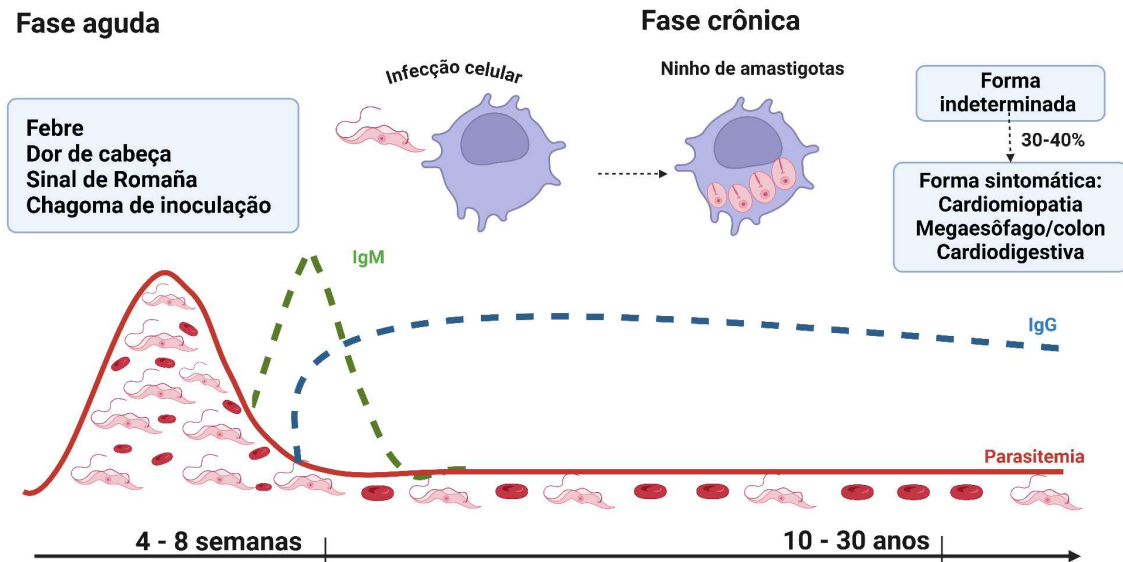
Para pacientes acima de 50 anos, o tratamento etiológico é considerado opcional, principalmente devido à falta de dados para esta faixa etária. O tratamento é contraindicado durante a gestação, para pacientes com insuficiência renal ou hepática, ou com megaesôfago e prejuízos à deglutição. Para pacientes com acometimento gastrointestinal, não há evidência de benefícios após o tratamento etiológico, sendo que intervenções corretivas (como cirurgias) podem ser empregadas. O monitoramento do sucesso terapêutico é outro desafio, visto que a negatização dos testes sorológicos (critério de cura) pode demorar anos ou décadas após o fim do tratamento (Bern et al., 2007; Dias et al., 2016).

Os fármacos disponíveis são pouco eficientes contra estágios intracelulares do parasito. Isso se deve à capacidade dos amastigotas intracelulares de permanecer durante longos períodos de tempo como formas “dormentes”, com redução de sua atividade metabólica e replicativa (Sánchez-Valdéz et al., 2018). Essas limitações reforçam a importância do entendimento da patogenia da DC e do desenvolvimento de novas formas de controle.

## 1.5 Aspectos clínicos

A DC apresenta duas fases: aguda e crônica. A fase aguda inicia-se no momento da infecção e pode durar até alguns meses. Durante a fase aguda, o sinal de Romaña (edema bipalpebral unilateral) e o chagoma de inoculação (lesão cutânea indolor, que se desenvolve no local de penetração do parasito) são os sinais característicos de porta de entrada desta fase, embora a maior parte das infecções seja assintomática ou inaparente. Outras manifestações clínicas observadas nesta fase são: febre, linfadenopatia, edema e hepatoesplenomegalia (Coura, 2007; Junqueira et al., 2010)

Nesta fase inicial, a parasitemia é evidente, possibilitando sua detecção por diferentes métodos parasitológicos. No entanto, a maioria dos pacientes passa pela fase aguda sem diagnóstico, evoluindo para a fase indeterminada, caracterizada pela ausência de manifestações clínicas (Rassi; Rassi; Marin-Neto, 2010). Aproximadamente 10%-30% dos indivíduos cronicamente infectados desenvolvem, décadas após a infecção, complicações viscerais na fase crônica, apresentando as formas cardíaca e digestiva (Figura 4) (Lidani et al., 2017; Pérez-Molina; Molina, 2018).



**Figura 4. Curso da infecção pelo *T. cruzi* e desenvolvimento clínico da doença de Chagas em humanos.** A fase aguda é normalmente sintomática e associada a uma alta parasitemia, parasitismo tecidual e grande ativação do sistema imune, com rápida produção de IgM. Sintomas característicos dessa fase são sinal de Romaña, chagoma de inoculação, febre, dores de cabeça. Durante a fase crônica, a parasitemia é escassa, com muitos pacientes assintomáticos (forma indeterminada). No entanto, 10- 30% dos pacientes chagásicos crônicos podem apresentar sintomatologia, principalmente distúrbios cardíacos e/ou digestivos. Nesta fase, a IgG é persistente, possibilitando o diagnóstico sorológico.

Fonte: Autoria própria

Nos últimos anos, a notificação da doença de Chagas oral aguda (DCOA) tem ganhado destaque, devido principalmente a casos de infecção por via oral, através do consumo de alimentos contaminados (Dias et al., 2016; Franco-Paredes et al., 2020; Shikanai-Yasuda; Carvalho, 2012). A DCOA induz uma forma aguda sintomática, com elevada mortalidade (até 10%), além de altas taxas de miocardite e meningoencefalite (Messenger; Miles; Bern, 2015). A severidade da infecção aguda, outrora atribuída principalmente ao alto inóculo de parasitos, também é decorrente do desenvolvimento de uma resposta imune exacerbada, com expressiva produção de citocinas pró-inflamatórias e o possível envolvimento do eixo intestino-fígado. Na DCOA, também podem ser observados sintomas clínicos como hepatoesplenomegalia, meningoencefalite, tosse, edema facial e hemorragia gastrointestinal, trazendo questionamentos sobre potenciais novos sítios de parasitismo (Barreto-de-Albuquerque et al., 2015; Pereira et al., 2009).

A infecção em pacientes imunossuprimidos (tais como aqueles com infecção avançada por HIV, receptores de transplantes de órgãos ou doenças autoimunes) pode ocasionar parasitemias elevadas, miocardite fulminante, meningoencefalite, abscessos cerebrais e lesões cutâneas (Antinori et al., 2017). Já nas formas de transmissão congênita da DC, os sintomas mais comuns são febre, hipotonicidade, hepatoesplenomegalia e anemia. Podem ocorrer também abortos prematuros ou baixo peso ao nascimento. Manifestações mais sérias incluem miocardite, meningoencefalite e pneumonite (Carlier & Truyens et al., 2015).

A maioria dos indivíduos em fase aguda sobrevive e evolui para uma fase crônica que pode ser assintomática (indeterminada) ou apresentar distúrbios e manifestações cardíacas, digestivas ou neurológicas. A forma indeterminada da DC corresponde ao período de infecção assintomática ou subclínica. Cerca de 70% dos indivíduos cronicamente infectados permanecem na forma indeterminada, de duração variável, podendo estender-se por meses ou anos. Esta forma é caracterizada pela: (1) positividade de dois métodos sorológicos diferentes com resultados concordantes, (2) ausência de sintomas, (3) ECG normal e (4) normalidade no exame radiológico do tórax, esôfago e cólon (Rassi JR et al., 2010; Marin-Neto et al., 2007).

Estudos epidemiológicos em áreas endêmicas mostraram uma taxa de progressão anual de 1,85–7% da forma indeterminada para as formas clínicas (determinadas) da doença, mais comumente cardiomiopatia. Aproximadamente, 10–30% dos indivíduos infectados desenvolvem formas cardíacas ou digestivas de doença de Chagas crônica. Fatores que contribuem para a progressão da fase sintomática são: taxas de reinfecção, cepa do *T. cruzi*, comorbidades (como imunossupressão) e predisposição genética do hospedeiro (Dias et al., 2016; Rassi et al., 2006).

Durante a fase crônica sintomática, o envolvimento cardíaco é a manifestação mais frequente e severa. A transição da forma indeterminada para a forma cardíaca se manifesta pelo aparecimento de alterações no ECG, como bloqueio parcial ou total do ramo direito, bloqueio fascicular anterior esquerdo, alterações das ondas ST-T ou contrações ventriculares prematuras. Conforme a doença avança, podem surgir bradiarritmias, bloqueios atrioventriculares, ondas q, taquicardia ventricular e fibrilação atrial (Dias *et al.*, 2016; Rassi *et al.*, 2006). A mortalidade na cardiomiopatia chagásica ocorre principalmente devido à morte súbita cardíaca (55-65%), insuficiência cardíaca congestiva (25–30%) e fenômenos tromboembólicos (10–15%). A mortalidade anual por todas as causas em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica estabelecida é de aproximadamente 7,9%, podendo ser ainda maior em estágios avançados da doença (Chadalawada *et al.*, 2021).

O acometimento gastrointestinal ocorre com manifestações digestivas principalmente devido à destruição dos plexos nervosos ao longo do trato digestório. Esse quadro clínico pode se apresentar de forma isolada ou em combinação com manifestações cardíacas (forma cardiodigestiva) (Bern *et al.*, 2007). A forma digestiva da infecção por *T. cruzi* afeta mais comumente o Cone Sul (Argentina, Bolívia, Chile, sul do Peru, Paraguai e partes do Brasil). Esta distribuição geográfica preferencial pode estar relacionada com diferenças regionais na distribuição de cepas de *T. cruzi*. O esôfago e o cólon distal são os segmentos do trato gastrointestinal mais comumente afetados. As alterações funcionais do megaesôfago podem ocasionar disfagia, regurgitação e dor epigástrica. Já as complicações decorrentes do megacólon podem ser constipação intestinal crônica e distensão abdominal (Meneghelli, 2004).

## **1.6 Modelo experimental e cepa Y**

Um modelo consolidado para avaliar aspectos biológicos associados à DC consiste na infecção experimental em animais, sendo este utilizado desde o início dos estudos da DC por Carlos Chagas (Chagas, 1909). Os camundongos, comumente empregados como modelo experimental na DC, são capazes de reproduzir características das fases aguda e crônica da DC, incluindo variáveis parasitológicas, imunológicas e histopatológicas. A severidade da infecção experimental depende de fatores como a via de inoculação, cepa de *T. cruzi*, idade e linhagem do camundongo (Błyszczuk, 2019). Devido à indução de células T auxiliares do tipo 1 (Th1), que favorece a eliminação dos parasitos por meio da produção de citocinas que estimulam os mecanismos microbicidas celulares, os camundongos C57Bl/6 são considerados

resistentes à infecção pelo *T. cruzi*, em comparação à linhagem BALB/c (Borges et al., 2009; Leão et al., 2025). Já os camundongos BALB/c, em contraste, desenvolvem predominantemente uma resposta do tipo Th2, favorável ao desenvolvimento do parasitismo, e por isto são considerados modelos experimentais suscetíveis.

A cepa Y, pertencente à DTU II (Zingales et al., 2009) é uma linhagem virulenta do *T. cruzi*, comumente utilizada em modelos experimentais devido ao seu curso de infecção com fases aguda e crônica previsíveis. Esta cepa apresenta uma parasitemia de crescimento rápido, com o pico de parasitemia já por volta do 9 dpi, decrescendo rapidamente até a negatificação pelo 30 dpi. A cepa Y induz uma inflamação tecidual aguda intensa, composta principalmente por células mononucleares. Essa infiltração inflamatória dos tecidos cardíacos do hospedeiro é crítica para a eliminação do parasita e é modulada pela expressão de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , produzidas tanto por células do sistema imune inato quanto por cardiomiócitos (Teixeira et al., 2002; Machado et al., 2000). A inflamação pode resultar em remodelamento tecidual e alterações funcionais, incluindo alterações no potencial de condução cardíaca (Mata-Santos et al., 2024).

### **1.7 Imunidade e patogênese da DC**

A persistência do parasitismo tissular tem uma participação direta no desenvolvimento de inflamação tecidual, patogêneses, comprometimentos fisiopatológicos, e manifestações clínicas da DC (Tarleton, 2001; Machado et al., 2012).

Durante a disseminação do *T. cruzi* pelo organismo, padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) são reconhecidos por receptores do tipo Toll (Toll-like receptors [TLR]) expressos na superfície de vários tipos celulares incluindo as células apresentadoras de antígenos (APCs), principalmente em macrófagos e células dendríticas. Esse reconhecimento inicial é crucial para o desencadeamento da resposta inflamatória, com a apresentação de antígenos às células T e a produção inicial de mediadores inflamatórios (Boscardin *et al.*, 2010). De fato, animais deficientes na via de sinalização mediada por receptores do tipo Toll, em infecções experimentais por *T. cruzi*, apresentam maior susceptibilidade e infecção aguda mais grave (Campos *et al.*, 2004). Moléculas produzidas pelo parasito, como glicosilinositolfosfolipídios (GIPLs), glicofosfatidilinositol (GPI) e seu próprio DNA (devido à presença de motivos CpG), são capazes de ativar TLRs, principalmente TLR2, TLR4, TLR7 e TLR9 (Bafica et al., 2006; Caetano et al., 2011; Campos et al., 2001).

A ativação de TLRs por moléculas do *T. cruzi*, mediada pelas vias de sinalização dependentes do fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) MyD88 e TRIF, resulta na ativação das vias do NF- $\kappa$ B e das quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Essas vias promovem a expressão de genes codificadores de mediadores imunológicos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (Gazzinelli; Denkers, 2006). Entre os principais mediadores pró-inflamatórios destacam-se o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina (IL)-12, cruciais para a resistência ao parasito (Silva *et al.*, 1995).

A ativação da imunidade adaptativa ocorre como consequência da resposta inata, sendo iniciada pela IL-12, que estimula células T a produzirem IFN- $\gamma$ . Essas células T migram em resposta a quimiocinas liberadas localmente e desempenham um papel central no combate ao parasito. O IFN- $\gamma$  também potencializa a atividade citotóxica de células T CD8+, promovendo a destruição de células infectadas (Silva *et al.*, 1995).

As células natural killer (NK), produtoras de IFN- $\gamma$ , e o óxido nítrico gerado pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em macrófagos, também desempenham papel protetor na infecção (Cardillo *et al.*, 1996; Fernandez *et al.*, 1992). A resposta humoral pode contribuir para o controle do parasitismo, possivelmente por meio da mediação de mecanismos de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (Rottenberg *et al.*, 1993; Gazzinelli e Denkers, 2006).

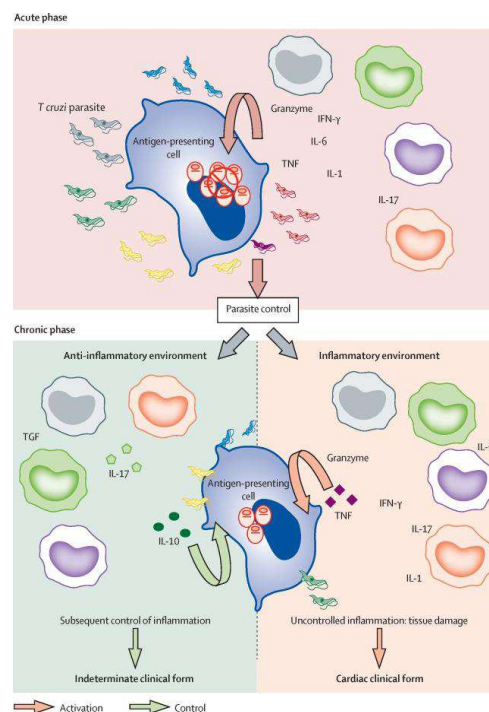
Durante a fase aguda da infecção, a invasão do tecido cardíaco e a presença de ninhos de amastigotas induzem a degeneração e necrose de cardiomiócitos, degeneração neuronal, dano microvascular e fibrose. A resposta imune é intensificada pela destruição dos cardiomiócitos e, conseqüentemente, pela liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), contribuindo para a contínua ativação do sistema imune (Andrade, 1999; Bonney *et al.*, 2019).

A DC é caracterizada pela ativação de uma robusta imunidade celular, composta principalmente por linfócitos T CD8+, células Th1, Th17 e citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-17 (Almeida *et al.*, 2018; Poveda *et al.*, 2014). Embora essa resposta inflamatória seja crucial para a eliminação do parasito, ela também pode causar danos teciduais, resultando em miocardite e nas alterações intestinais e neurológicas observadas na DC (Clayton, 2010; Tarleton, 2001).

O curso para a progressão da cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) está relacionado às propriedades genéticas do hospedeiro e parasito (Hidron *et al.*, 2010; Hoffman *et al.*, 2019). A CCC é caracterizada por um infiltrado de células mononucleares, constituído

principalmente por macrófagos e células T CD8+, além de fibrose intersticial progressiva (Higuchi et al., 1993; Higuchi, 1995).

Neste contexto, as citocinas IL-10, IL-4 e o fator de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ), desempenham um papel regulador, prevenindo o aumento do processo inflamatório (Hunter *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 1995). As células T reguladoras (Tregs) são importantes moduladores de mecanismos pró-inflamatórios durante a cardiomiopatia chagásica, sendo importantes fontes de IL-10 e TGF- $\beta$ , regulando a ativação prolongada de células T CD8+ e T CD4+ (Damasio et al., 2019; Neves et al., 2022; Almeida et al., 2022). A inibição experimental das células Tregs induz miocardite e mortalidade precoce na fase aguda da infecção por *T. cruzi* (Mariano et al., 2008). De fato, pacientes com a forma crônica sintomática apresentam altos níveis de IFN- $\gamma$ , e quimiocinas relacionadas, além de uma ativação persistente de células T (CD69+ CD4+) (Roffe et al., 2019; Almeida et al., 2022). Em contraste, pacientes na forma indeterminada apresentam maiores níveis séricos de IL-10, evidenciando a importância das células reguladoras na imunorregulação da DC (Gomes et al., 2003). A figura 5 ilustra os principais mecanismos envolvidos no controle do parasitismo e progressão da doença.



**Figura 5. Visão geral da resposta imune durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*.** Na fase aguda, uma forte resposta inflamatória com citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF controla a replicação do parasita. Na fase crônica, a resposta pode seguir dois caminhos: um ambiente anti-inflamatório (com IL-10 e TGF- $\beta$ ) que leva à forma indeterminada, ou a persistência de um ambiente inflamatório que causa danos teciduais e leva à forma clínica cardíaca.

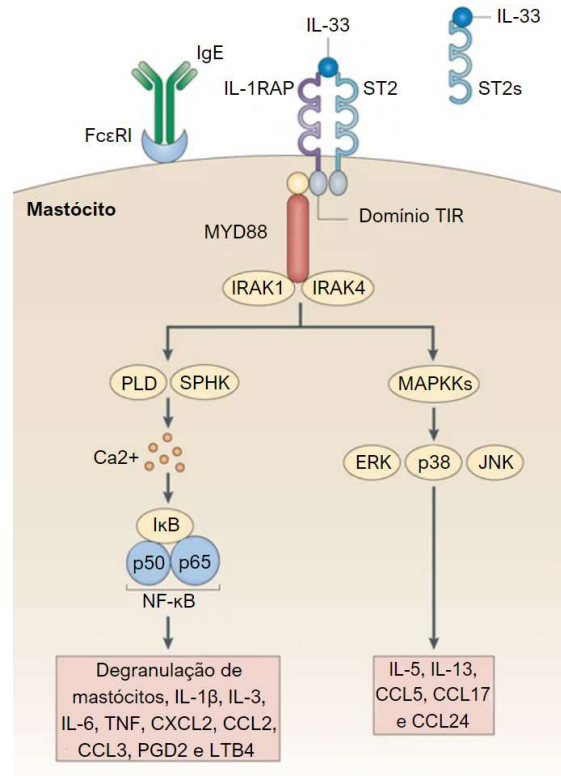
Figura adaptada de: Magalhães et al., 2022.

Após infecções ou danos celulares, moléculas sinalizadoras de agressão, conhecidas como alarminas, são liberadas no meio extracelular, interagindo com receptores expressos por células envolvidas na imunidade inata e adaptativa. Alarminas derivadas de células epiteliais, como IL-33, IL-25 e a linfopoiétina estromal tímica (TSLP, do inglês Thymic Stromal Lymphopoietin), têm a função de "ativar" o sistema imunológico, promovendo o recrutamento e a ativação de leucócitos por meio da interação com seus receptores (Dobrican-Băruța et al., 2024; Oppenheim et al., 2007). Essas alarminas podem induzir respostas do tipo Th1 ou Th2, atuando em infecções por protozoários ou helmintos. Nesse contexto, a IL-33 parece desempenhar um papel ainda pouco explorado durante a infecção pelo *T. cruzi* (Medeiros et al., 2019; Oliveira et al., 2022; Boccardo et al., 2025).

### **1.8 Imunobiologia do eixo IL-33/ST2**

A IL-33 é uma citocina pertencente à família da IL-1, com propriedades envolvidas em proteção e patogênese (Liew; Girard; Turnquist, 2016). A IL-33 se liga ao seu receptor supressor de tumorigenicidade 2 (ST2), membro da família de receptores do tipo Toll, e demasiadamente expresso no organismo humano e murino; e ao co-receptor da IL-1 (IL-1RAcP) formando o complexo IL-33/ST2/IL1RAcP (Schmitz et al., 2005) (Figura 6). O receptor ST2 pode ser encontrado na forma ligada a membrana (ST2L), com domínios extracelular, transmembrana e citoplasmático; e em uma forma solúvel e secretada (ST2s) (Bergers et al., 1994). Enquanto o ST2L é responsável por interagir com a IL-33 e desencadear o processo de ativação de mediadores imunes, o ST2s, ao ligar-se com a IL-33, diminui sua disponibilidade, evitando sua atuação exacerbada (Fagundes et al., 2007; Pastorelli et al., 2013).

Quando o complexo IL-33/ST2/IL1RAcP é formado, ele ativa uma via de sinalização por meio do domínio TIR e do MyD88, resultando na ativação de duas vias principais: uma dependente de cálcio, que culmina na ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, levando à produção de quimiocinas (CXCL2, CCL2, CCL3) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6 e TNF), e outra dependente de MAP quinases (MAPK), estimulando também a produção de citocinas e quimiocinas (Ali et al., 2007; Bae et al., 2012; Cayrol & Girard, 2018; Liew, Pitman & McInnes, 2010; Schmitz et al., 2005).



**Figura 6: Formação do complexo IL-33/ST2/IL1RAcP e ativação da via IL-33/ST2.** A IL-33 liga-se ao receptor ST2, recruta o co-receptor IL-1RAcP e ativa os domínios TIR; há o início da transdução de sinais, resultando na indução de mediadores inflamatórios.

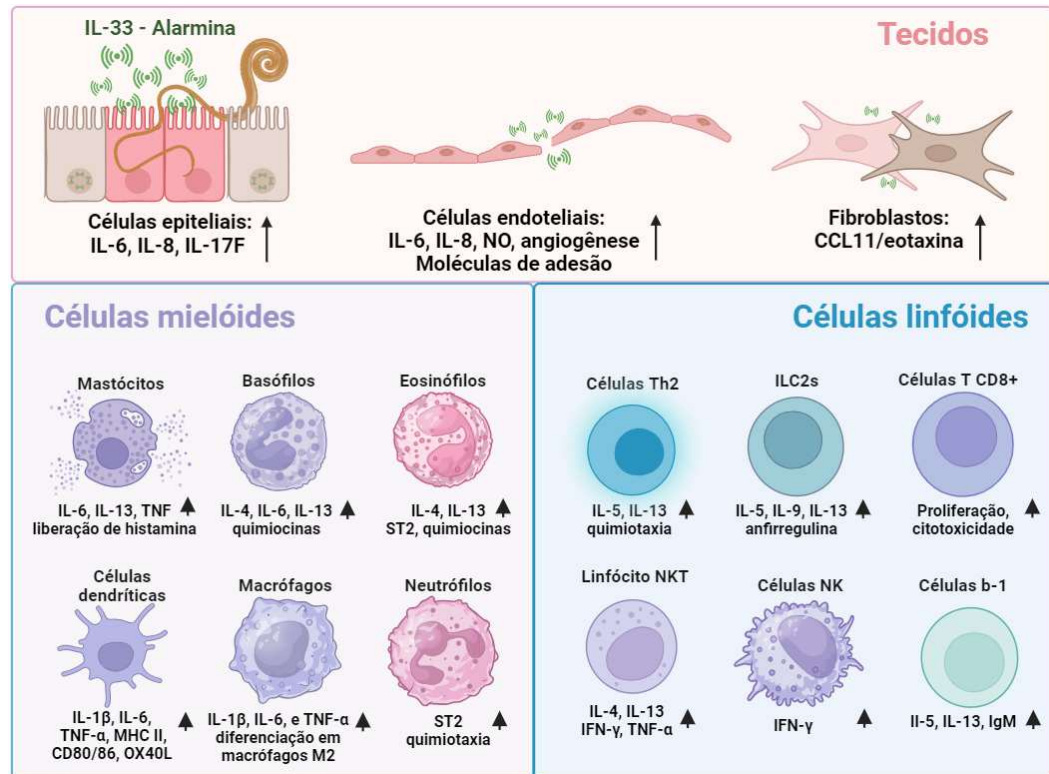
Figura adaptada de: Liew et al., 2010.

O receptor ST2 é expresso na superfície de uma ampla variedade de células, como células epiteliais, endoteliais, células Th2, Th1 e Treg (Liew; Girard; Turnquist, 2016; Ohno et al., 2012). Apesar de presente no organismo murino e humano no estado de homeostase, a expressão da IL-33 pode aumentar durante a inflamação, particularmente em quadros de fibrose tecidual e reparo de mucosas ou cicatrização de feridas (Liew; Girard; Turnquist, 2016).

A IL-33 é abundante no espaço nuclear e pode ser considerada uma “alarmina”, pois é caracteristicamente liberada por células danificadas ao meio extracelular após dano celular; atuando como um sinal de alerta para células que expressam o receptor ST2 (Baekkevold et al., 2003; Carriere et al., 2007; Küchler et al., 2008; Kurowska-Stolarska et al., 2011; Liew; Pitman; McInnes, 2010; Moussion; Ortega; Girard, 2008).

A IL-33 apresenta uma atividade biológica pleiotrópica. Dependendo dos estímulos, a IL-33 pode modular tanto respostas do tipo Th1 quanto Th2 (Milovanovic et al., 2012). Tipicamente, é uma citocina envolvida na indução da resposta do tipo Th2, pelo estímulo à citocinas como IL-5 e IL-13, e da ativação de células como eosinófilos e células linfoides

inatas do tipo 2 (ILC2s) (Matsushita; Yoshimoto, 2014). No entanto, em determinadas situações, a IL-33 pode atuar aumentando a produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12, estimulando a diferenciação de células Th1 *in vitro* e *in vivo* (Blom; Poulsen, 2012; Bourgeois et al., 2009; Komai-Koma et al., 2016; Matsushita; Yoshimoto, 2014; Smithgall et al., 2008) (Figura 7).



**Figura 7: IL-33 e sua atividade biológica pleiotrópica.** Após dano tecidual ou inflamação, a IL-33 é liberada, atuando sobre células adjacentes como uma alarmina.

**Fonte:** Autoria própria.

Após o descobrimento e caracterização da IL-33 e do receptor ST2, estudos têm investigado seus papéis em diversos contextos: a IL-33 e o receptor ST2 são amplamente expressos no cérebro (Guo et al., 2023). A ação neuroprotetora da IL-33 tem início após injúria no sistema nervoso central, sendo liberada por oligodendrócitos e promovendo recrutamento celular e reparo tecidual (Gadani et al., 2015). Na fibrose hepática, o aumento da expressão de IL-33 e ST2 está associado a uma inflamação do tipo Th2, relacionada à severidade da fibrose em camundongos e humanos (Marvie et al., 2010).

No coração, a IL-33 é expressa em diferentes células, incluindo cardiomiócitos, células endoteliais e epiteliais. Em camundongos deficientes para ST2, após a indução de constrição aórtica, ocorre hipertrofia do miocárdio e dilatação dos ventrículos, evidenciando o

papel cardioprotetor da IL-33 (Sanada et al., 2007). Durante a miocardite induzida pelo vírus Coxsackievirus B3 (CVB3), o aumento dos níveis de IL-33 atenua a inflamação e melhora a função cardíaca, via indução de resposta TH2 e ativação de linfócitos T CD4+ e macrófagos cardíacos expressando o receptor ST2L (Abston et al., 2012; Wang et al., 2016).

Macrófagos cardíacos podem ser classificados conforme a expressão de MHC II e CCR2. Durante dano cardíaco, os macrófagos residentes são predominantemente substituídos por monócitos infiltrantes e macrófagos derivados de monócitos. No tecido cardíaco, os monócitos exibem funções pró-inflamatórias e fagocíticas exuberantes, estando associados à remodelação e função cardíaca prejudicadas (Dewald et al., 2005). O recrutamento de monócitos é orquestrado principalmente por macrófagos CCR2+, por meio de um mecanismo dependente de MYD88, que resulta na liberação de MCPs (proteínas quimiotáticas de monócitos). Em contraste, os macrófagos CCR2- residentes inibem o recrutamento destas células (Bajpai et al., 2019).

No contexto de doenças cardíacas, a mobilização e infiltração de monócitos estão associadas a resultados adversos, incluindo potencialização da inflamação cardíaca, dilatação e perda da função (Leuschner et al., 2012; Dutta et al., 2015). Embora ST2 e IL-33 sejam expressos em macrófagos presentes nas valvas cardíacas, seu papel na dinâmica de macrófagos cardíacos e no desenvolvimento de miocardite permanece indeterminado (Sawada et al., 2019).

### **1.9 O papel do eixo IL-33/ST2 em infecções parasitárias**

Nas helmintíases, a IL-33 liberada por células epiteliais tem papel na inflamação pulmonar, eosinofilia e expulsão de vermes, principalmente pela indução de ILC2s, as quais são estimuladas pela IL-33 a produzir IL-5 e IL-13 (Kamdem et al., 2019; Leal-Silva et al., 2021; McSorley; Smyth, 2021; Ryan et al., 2020; Yasuda et al., 2012). Na infecção por *Schistosoma mansoni*, a deficiência de receptor ST2 prejudica a formação dos granulomas hepáticos, resultando em maior mortalidade e morbidade durante a infecção (Maggi et al., 2021, 2023).

Já no contexto de protozooses, pacientes com malária severa ou leishmaniose visceral apresentam aumento nos níveis séricos de IL-33, sugerindo o envolvimento da citocina na progressão dessas infecções (Ayimba et al., 2011; Rostan et al., 2013). Em modelos murinos, a ausência do receptor ST2 confere a resistência à leishmaniose em camundongos infectados com *Leishmania donovani* ou *L. major* via indução da resposta Th1 e redução da carga parasitária (Lamberet et al., 2020; Rostan et al., 2013). Na malária grave

por *Plasmodium berghei* ANKA camundongos ST2<sup>-/-</sup> não desenvolvem déficits cognitivos; possivelmente devido à redução da neuroinflamação mediada por oligodendrócitos (Reverchon et al., 2017). Na infecção com *Toxoplasma gondii*, a ausência do receptor ST2 potencializa o desenvolvimento de encefalite pelo aumento da expressão de mediadores inflamatórios (iNOS, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) (Jones et al., 2010).

Na infecção *in vitro* por *T. cruzi*, Oliveira e colaboradores (2022) observaram que o estímulo com IL-33 é capaz de induzir a produção de mediadores inflamatórios e diminuir o número de amastigotas, sugerindo seu papel na modulação da resposta inflamatória frente ao parasito. Considerando a atuação pleiotrópica do eixo IL-33/ST2, seu papel na doença de Chagas precisa ser melhor investigado, especialmente em modelos experimentais. Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo investigar o papel do eixo IL-33/ST2 na progressão da infecção experimental pelo *T. cruzi*

## 2 JUSTIFICATIVA

A DC é uma doença tropical negligenciada que afeta principalmente populações vulneráveis. Embora seja uma infecção de crescente presença global, a DC é um grave problema de saúde em áreas endêmicas de 21 países da América Latina, com 75 milhões de pessoas consideradas em risco de infecção. Desde a sua descoberta no Brasil por Carlos Chagas em 1909, a ausência de vacinas e de opções terapêuticas mais eficazes faz com que a DC permaneça como um importante desafio de saúde pública nas Américas. Além disso, os medicamentos disponíveis, o benznidazol e o nifurtimox, são associados a efeitos adversos, como cefaleia, depressão medular e reações alérgicas, que podem se manifestar durante o longo período de administração de dois meses.

Durante a infecção pelo *T. cruzi*, o organismo desenvolve uma robusta resposta inflamatória, que é crucial para controlar a replicação parasitária. Contudo, se essa resposta não for devidamente regulada, pode resultar no comprometimento de múltiplos órgãos. Embora a maioria dos indivíduos infectados permaneça assintomática, apresentando o perfil indeterminado da doença, cerca de 10% a 30% dos pacientes desenvolvem complicações viscerais, principalmente cardíacas e gastrointestinais. Os determinantes exatos responsáveis pelos variados espectros clínicos da DC ainda não são completamente conhecidos; sabe-se, porém, que as citocinas produzidas no início da infecção direcionam o perfil de resposta imune adaptativa e são essenciais para o controle ou a suscetibilidade à infecção, influenciando a sua patogênese. Neste contexto, embora a via IL-33/ST2 pareça exercer um papel na resposta imune contra o *T. cruzi*, sua função em modelos *in vivo* ainda não foi caracterizada. Acreditamos que esse eixo possa influenciar o perfil de resposta inflamatória e, conseqüentemente, a imunopatogênese da DC. A elucidação dos mecanismos imunológicos atuantes no estabelecimento da resposta imune da infecção é considerada extremamente relevante, principalmente para melhor compreender os mecanismos de regulação e patogênese; entender os mecanismos subjacentes aos diferentes desfechos da infecção; e auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle da doença.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do receptor ST2 na infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi*.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o papel do receptor de IL-33 (ST2) no curso da infecção aguda por *T. cruzi*, através de parâmetros como parasitemia, sobrevivência, alterações no peso corporal, consumo alimentar, e manifestações de sinais clínicos dos camundongos geneticamente deficientes para o receptor ST2 e em seus respectivos animais selvagens BALB/c;

2. Determinar o impacto do receptor ST2 no desenvolvimento de inflamação, dano tecidual e disfunção hepática dos camundongos ST2<sup>-/-</sup> e em seus respectivos animais selvagens BALB/c, durante a infecção aguda por *T. cruzi*;

3. Avaliar o papel do receptor ST2 no desenvolvimento de alterações inflamatórias e funcionais intestinais em camundongos ST2<sup>-/-</sup> e em seus respectivos animais selvagens BALB/c, durante a infecção aguda por *T. cruzi*;

4. Caracterizar o papel do receptor ST2 no desenvolvimento de miocardite, alterações funcionais e fibrose nos camundongos ST2<sup>-/-</sup> e em seus respectivos animais selvagens BALB/c, durante a infecção aguda por *T. cruzi*;

5. Determinar o papel do receptor ST2 na modulação da resposta imune, pela caracterização da atividade celular tecidual de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, avaliação do perfil de leucócitos circulantes e caracterização de subpopulações mieloides e linfoides do baço e coração dos camundongos camundongos ST2<sup>-/-</sup> e em seus respectivos animais selvagens BALB/c, durante a infecção aguda por *T. cruzi*.

## 4 METODOLOGIA

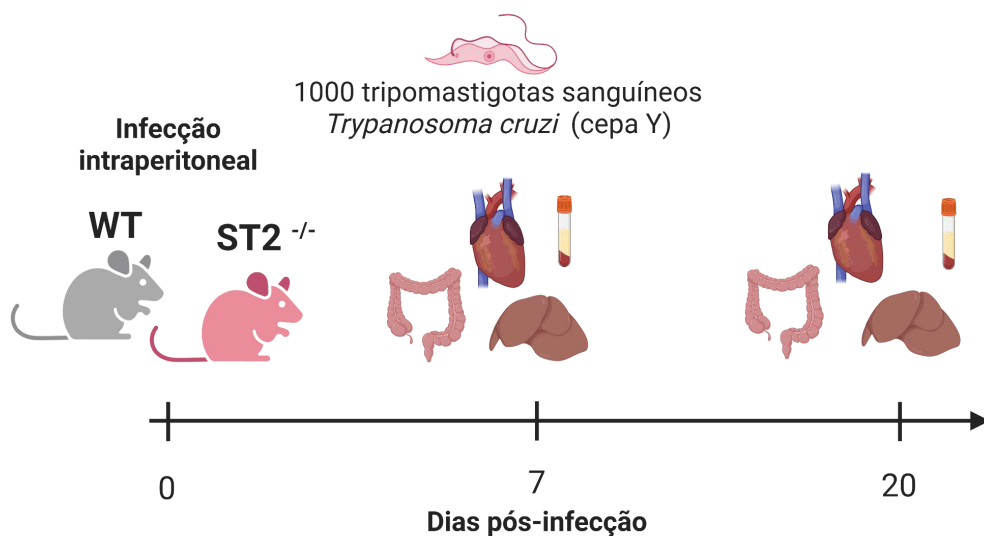
### 4.1 Manutenção das cepas e obtenção dos parasitos

Foram utilizados parasitos da cepa Y de *T. cruzi* (Tc II), mantidos em camundongos Swiss. Os animais foram inoculados intraperitonealmente (ip) com  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y, diluída em PBS 1X.

### 4.2 Considerações éticas, animais e delineamento experimental

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), geneticamente deficiente para  $ST2^{-/-}$ , e da linhagem selvagem (WT) BALB/c, fêmeas, de 8 a 10 semanas de idade. Os camundongos foram obtidos do Biotério Central da UFMG, e mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia, do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, sob ciclo luminoso de 12h/12h de claro/escuro; e fornecimento de água e ração *ad libitum*. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (protocolo CEUA 12/2024).

Os animais foram organizados em quatro grupos: grupo com camundongos selvagens não infectados, grupo com camundongos selvagens infectados, grupo com camundongos nocautes ( $ST2^{-/-}$ ) não infectados e grupo com camundongos nocautes infectados. Os camundongos foram eutanasiados (conforme item 4.6) e avaliados durante a fase aguda (Figura 8). Os animais foram acompanhados para avaliação da massa corporal, consumo alimentar, desenvolvimento de alterações clínicas e sobrevida.



**Figura 8: Delineamento experimental.**

### **4.3 Determinação da parasitemia**

A parasitemia foi determinada conforme Brener (1962). Após a coleta de 5  $\mu$ L do sangue obtido da veia caudal dos camundongos, o sangue foi depositado entre lâmina e lamínula e observado em aumento de 400x. Cinquenta campos da lâmina foram examinados e as formas tripomastigotas sanguíneas quantificadas para determinar as curvas de parasitemia.

### **4.4 Avaliação do perfil hematológico**

O sangue coletado foi destinado para avaliação hematológica pelo hemograma e contagem diferencial de leucócitos. O perfil hematológico dos animais foi avaliado por meio de contador hematológico automatizado Bio-2900 Vet (Bioeasy, EUA). Também foi realizada a contagem diferencial das populações de linfócitos, neutrófilos e monócitos para determinar o número relativo (%). Os esfregaços foram examinados por microscopia óptica na objetiva de 100x com imersão em óleo por meio da contagem 100 leucócitos em lâmina de distensão sanguínea, obtida a partir de 5  $\mu$ L de sangue e, posteriormente, corada com Giemsa. Para determinação do número absoluto (total/mm<sup>3</sup>) das populações de linfócitos, foram considerados: leucócitos totais x número relativo/100.

### **4.5 Escore clínico**

O desenvolvimento de sintomas clínicos com a progressão da infecção foi avaliado com base em parâmetros como coordenação motora, comportamento exploratório, força e tônus, reflexos e higiene (Carroll et al., 2010). Para cada variável, foi atribuída uma pontuação de 0, 1 ou 2, conforme a intensidade do sinal observado, com o escore máximo de 20.

### **4.6 Eutanásia**

Os animais foram eutanasiados utilizando sobredosagem de anestésico (300 mg/Kg de Cetamina e 30 mg/Kg de Xilazina) aplicado por via ip. Logo em seguida, o sangue foi coletado por meio da punção cardíaca. Parte do sangue coletado foi transferido para coleta de soro e caracterização do perfil bioquímico. Em seguida, os órgãos foram coletados para as análises patológicas e imunológicas.

### **4.7 Dosagens bioquímicas hepáticas**

Para avaliar a função hepática dos animais, foram determinadas as concentrações séricas de Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), e albumina.

A dosagem desses parâmetros foi realizada no soro por meio de kits comerciais (Bioclin Quibasa, Brasil), conforme instruções do fabricante.

#### **4.8 Avaliação da atividade celular nos tecidos**

As amostras de tecidos, coletadas de camundongos WT e ST2<sup>-/-</sup> infectados com *T. cruzi* e seus respectivos controles, foram processadas e utilizadas para estimar a infiltração/atividade de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos indiretamente, por meio da determinação da atividade enzimática, conforme descrito a seguir (Nogueira et al., 2021).

##### **4.8.1 Determinação de N-acetilglicosaminidase (NAG)**

A atividade de macrófagos nos tecidos foi estimada pela determinação da atividade da enzima N-Acetilglicosaminidase (NAG). Inicialmente, cerca de 100 mg dos tecidos foram pesados e processados em um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125; Fisher Scientific Pennsylvania, EUA) em 950 µl de tampão de extração (NaCl 0,1 M, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,02 m e Na<sub>2</sub>EDTA 0,015M ph 4,7). O homogenato foi centrifugado a 3000 x g a 4°C por 10 min. O sedimento resultante foi ressuspense e homogeneizado em 800 µl de solução de NaCl 0,9% contendo 0,1% de triton x-100. posteriormente, 100 µl do sobrenadante foram distribuídos em microplaca de 96 poços, seguidos da adição de 100 µl do substrato p-nitrofenil-N-acetil-βD-Glucosaminida (Sigma Chemical Co®, EUA) diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 m, na<sub>2</sub>hpo<sub>4</sub> 0,1 m, ph 4,5). as amostras foram incubadas a 37 °c por 10 minutos; a reação foi interrompida pela adição de 100 µl de tampão glicina 0,8 m (glicina 0,8 M, NaCl 0,8 M e NaOH 0,8 M, pH 10,6) e a absorbância foi determinada a 405 nm em um leitor de microplacas Versamax® (Molecular Devices, EUA).

##### **4.8.2 Determinação de Peroxidase Eosinofílica (EPO)**

A atividade de eosinófilos nos tecidos foi estimada pela determinação da atividade da peroxidase eosinofílica (EPO). Inicialmente, cerca de 100 mg dos tecidos foram pesados e processados em um homogeneizador de tecidos com tampão de homogeneização (contendo 0,5 % de Tween 20; 0,5% de BSA-Fitzgeral; 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), 0,1mM de cloreto DE benzetônico, 10 mM de EDTA e 20 UI/ML de aprotinina). O homogeneizado resultante foi dividido em duas partes (uma parte para EPO e outra para a dosagem de MPO, conforme item 4.8.3). Para a quantificação da EPO, o sedimento foi centrifugado a 3000 x g a 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspense em 950 µL de PBS contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio

(HTAB). As amostras foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido, centrifugadas a 3000 g a 4°C por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático; para isto, 75 µL de cada amostra, juntamente com 75 µL da solução do substrato (tampão Tris-HCl pH 8,0 contendo 1,5 mM DE o-fenilenodiamina (OPD) e 6,6 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), foram distribuídos em placas de 96 poços. Após o desenvolvimento de cor, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A absorbância foi lida a 492 nm em leitor para microplacas VersaMax® ELISA (Molecular Devices, EUA).

#### **4.8.3 Determinação de Mieloperoxidase (MPO)**

A atividade de neutrófilos nos tecidos foi estimada pela determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO). A outra parte do sedimento obtida conforme o item 4.8.2 foi utilizada. As amostras foram centrifugadas a 3000 x g a 4°C por 10 min. O sedimento foi ressuspenso com 200 µL de tampão fosfato (0,1 M NaCl, 0,02 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,015 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 4,7). A solução foi homogeneizada e centrifugada a 3000 x g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi homogeneizado novamente em tampão (0,05 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 5,4 acrescido de 0,5 % DE HTAB), seguido de três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Posteriormente, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 3000 x g a 4°C e o sobrenadante distribuído em placas de 96 poços contendo 25 µL de substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração final de 1,6 mM. Em seguida, foi feita a incubação a 37 °C por 5 min. Foram adicionados 100µL da solução contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM diluído em tampão fosfato (0,05 M de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,4 contendo 0,5% de HTAB) e a placa foi incubada a 37 °C por 5 min. A interrupção da reação foi dada pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A absorbância foi lida a 450 nm em leitor para microplacas VersaMax® ELISA (Molecular Devices, EUA).

#### **4.9 Análise histopatológica**

Para a análise histopatológica, foram utilizados o coração, fígado (lobo direito) e intestino (cólon). Após coleta, o coração e fígado foram fixados em solução tamponada de formaldeído a 10% (Synth, Brasil). O intestino foi aberto longitudinalmente, transferido para um papel filtro com a superfície da mucosa voltada para cima, e o tecido foi submerso em solução saturada de ácido pícrico (C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>), acrescida de 10 volumes de formol a 25% e 2 volumes de ácido acético glacial a 1%, no qual foram mantidos por 5 minutos. Posteriormente, o tecido foi enrolado e amarrado com uma linha, e fixado em solução tamponada de formaldeído a 10% (Synth, Brasil). Após sete dias, as amostras foram

gradualmente desidratadas em etanol, diafanizadas no xilol e incluídas em blocos de parafina. A desidratação, diafanização e inclusão em parafina foram realizadas pela empresa CELULAVET (Belo Horizonte, Minas Gerais). Foram obtidos cortes de 4 µm de espessura com os quais foram confeccionadas lâminas histopatológicas e coradas com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação da presença de ninhos de amastigotas e infiltrados inflamatórios. Para avaliar o desenvolvimento de fibrose, parte dos cortes foi submetida à coloração por Tricrômico de Masson. Os tecidos foram analisados utilizando o software KS300 acoplado a um analisador de imagem Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha).

**Tabela 1.** Análise histológica semiquantitativa do coração de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.

<b>Análise semiquantitativa do coração</b>	
<b>Score</b>	<b>Lesão cardíaca</b>
Grau 0	Ausência de focos inflamatórios.
Grau 1	Presença de leves focos inflamatórios isolados no miocárdio.
Grau 2	Focos inflamatórios discretos.
Grau 3	Inflamação difusa.
Grau 4	Inflamação difusa, com focos inflamatórios maiores com frequência.

**Tabela 2.** Análise histológica semiquantitativa do fígado de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.

<b>Análise semiquantitativa do fígado</b>	
<b>Score</b>	<b>Lesão hepática</b>
Grau 0	Sem inflamação, ausência de células inflamatórias
Grau 1	Pequenos focos inflamatórios esparsos no parênquima hepático, número reduzido de células inflamatórias
Grau 2	Focos inflamatórios moderados, infiltração perivascular e periportal
Grau 3	Extensos focos inflamatórios, infiltrado difuso e abundante perivascular e periportal

**Tabela 3.** Análise histológica semiquantitativa do intestino grosso de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.

<b>Análise semiquantitativa do cólon</b>	
<b>Escore</b>	<b>Lesão colônica</b>
Grau 0	Sem inflamação, ausência de células inflamatórias.
Grau 1	Leve edema na mucosa, pouco ou nenhum infiltrado inflamatório.
Grau 2	Infiltrado inflamatório discreto, sem lesão dos enterócitos.
Grau 3	Inflamatório discreto a moderado, leve infiltrado na mucosa.
Grau 4	Infiltrado inflamatório moderado, infiltrado na submucosa leve a moderado.
Grau 5	Mucosa com infiltrado inflamatório moderado a intenso.
Grau 6	Mucosa com infiltrado inflamatório difuso e intenso.

#### **4.10 Avaliação da função intestinal**

Para estimar o tempo de trânsito intestinal total, os camundongos receberam gavagem por via oral com 100 µl de solução de corante vermelho carmim a 6% p/v em metilcelulose a 0,5% (Merck, EUA). Após 60 minutos, os camundongos foram alojados individualmente e o tempo para a excreção do primeiro pellet fecal contendo corante vermelho foi registrado. Para minimizar o estresse excessivo, foi implementado um tempo limite máximo de 4 horas para o ensaio. O tempo de trânsito intestinal total foi calculado como o tempo decorrido entre a gavagem e a eliminação do primeiro pellet fecal vermelho.

Para a análise fecal, os pellets fecais produzidos durante os 30 minutos após o alojamento individual foram coletados e pesados para determinação do peso úmido. As fezes foram secas por 48 horas a 70 °C e posteriormente pesadas novamente, para determinação do peso seco (Gallego et al., 2020; Choi et al., 2021).

#### **4.11 Dosagem de Creatina Quinase miocárdica (CK-MB)**

Para estimar a intensidade de lesão miocárdica, foi determinada a concentração da isoenzima Creatina Quinase miocárdica (CK-MB) no plasma, durante a fase aguda da infecção, conforme instruções do fabricante (Bioclin Quibasa, Brasil). A absorbância foi lida a 340 nm em leitor para microplacas VersaMax® ELISA (Molecular Devices, EUA).

#### **4.12 Avaliação da função cardíaca**

A função cardíaca foi avaliada utilizando-se um eletrocardiógrafo não invasivo de seis canais (ECG-PC versão 2.07-Tecnologia® Elétrica Brasileira (TEB), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). Os animais foram sedados com isoflurano a 2,5% e mantidos a 1,5% (VetCase – Incotec, Serra, ES, Brasil). Os animais foram colocados em decúbito dorsal sobre uma mesa de madeira coberta com material plástico. Para a execução do procedimento, gel condutor foi aplicado e quatro eletrodos do tipo “clipe de jacaré” foram fixados na pele dos membros torácicos e posteriores. Todos os procedimentos foram realizados em sala silenciosa para minimizar o estresse.

#### **4.13 Citometria de fluxo do baço**

Para caracterizar o perfil imune celular dos camundongos, o baço dos mesmos foi coletado e os esplenócitos isolados e analisados por citometria de fluxo multiparamétrica. Cada baço coletado foi macerado em PBS 1x estéril e filtrado com auxílio de uma membrana de nylon (Cell Strainer 70  $\mu$ m, BD Biosciences, EUA) em tubo falcon de 50 mL (Olen, China). A suspensão celular foi centrifugada a  $1190 \times g$  por 6 minutos, a 4°C e o sobrenadante descartado. Em seguida, o pellet foi incubado com 4 mL de solução de lise de hemácias (NH<sub>4</sub>Cl 0,15M, KHCO<sub>3</sub> 10mM, EDTA 0,1mM) por 5 minutos, à temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 3 mL de meio RPMI (Sigma, EUA) e os leucócitos foram contados (Countess II, Life Technologies, EUA). Após este processo,  $1 \times 10^6$  células foram transferidas para um tubo de citometria e incubadas com brefeldina (1:1000) (BD GolgiPlug, BD Biosciences, EUA) por 4h. Os tubos foram submetidos a centrifugação a  $1190 \times g$  por 5 minutos, a 4°C, o sobrenadante descartado e o pellet incubado com corante de viabilidade (1:1000) por 10 minutos, a 4°C. Posteriormente, as células foram incubadas com um mix de anticorpos por 15 minutos, a 4°C, e com anticorpos intracelulares por 30 minutos, ao abrigo da luz. As amostras foram ressuspensas em 200  $\mu$ L/poço de PBS 1x e transferidos para tubos FACS. As células foram adquiridas em citômetro FACSymphony (BD Biosciences, San Jose, USA) e analisadas com o software FlowJo (Tree Star, Ashlan, OR). As amostras foram marcadas com os seguintes anticorpos: CD4-PECY7 (clone GK1.5, 1:1000), CD8-FITC (clone 53-6.7, 1:800), CD25-PE (clone PC61.5, 1:100), FOXP3-AF700 (clone MF-14, 1:100), CD69-APCCY (clone H1.2F3, 1:100), TNF-BV421 (clone MP6-XT22, 1:100), IFN-PECF (clone XMG1.2, 1:100), IL-4-BV711 (clone 11B11, 1:100) IL-10-APC (clone JEs5-16E3, 1:100), Viabilidade-BV510 (clone: RM4-5, 1:1000), CD45- PEKY7 (clone 30-F11, 1:800), LY6G-Percp (clone 1AB, 1:400), CD11b-eFLUOR450 (clone:M1/70, 1:400), CD62L-PECF (clone MEL-14, 1:800), LY6C-BV570 (clone HK1.4, 1:800), CD44-BV570 (clone IM7,

1:100), CCR7-BV786 (clone: 4B12, 1:100), IL-10-APC (clone JeS5-16E3, 1:100), TNF-FITC (1:100) e IL-12-PE (clone C17.8, 1:50).

#### 4.14 Citometria de fluxo do coração

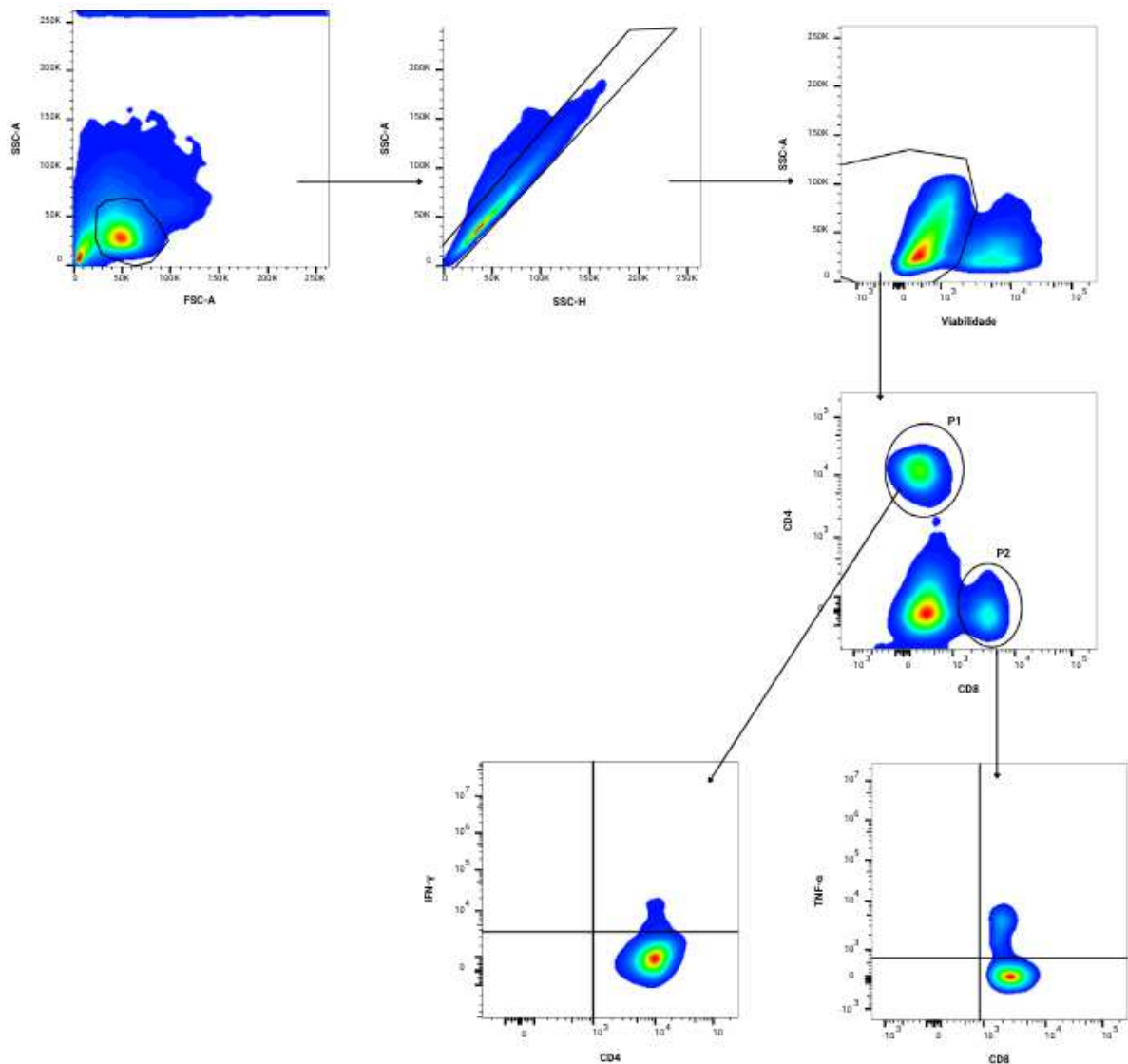
Os camundongos foram perfundidos com PBS 1x gelado. Posteriormente, o coração dos animais foi removido, limpo e fragmentado em porções de 1-2 mm. Ao tecido picotado, foi adicionado 3 mL de solução contendo meio RPMI + brefeldina (1:1000) e 50  $\mu$ L do mix de enzimas digestivas (Hialuronidase, DNase I e Collagenase II). A digestão foi feita em solução contendo 300 unidades de DNase I, 625 unidades de collagenase II (Sigma-Aldrich), e 50 unidades de hyaluronidase II (Sigma-Aldrich). O tecido foi incubado em shaker a 37 graus por 30 minutos. Posteriormente, o órgão foi macerado com auxílio de Cell Strainer (70  $\mu$ m; Becton Dickinson, Brasil) com adição de até 7 mL de PBS 1x, seguido de centrifugação a  $1190 \times g$  por 5 min. Em seguida, as células imunes do tecido foram incubadas com tampão de lise de eritrócitos ACK por 4 min a 4 C, seguido de adição de 10 mL de RPMI e centrifugação a  $1190 \times g$  por 5 min). As células foram então plaqueadas e incubadas com Brefeldin A (10  $\mu$ g/mL) (Invitrogen) por 4h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, 300  $\mu$ L de PBS foram adicionados e centrifugados a  $1190 \times g$  por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi removido, soro normal (soro proveniente de animais não infectados) foi adicionado e incubado por 30 min. Posteriormente, os leucócitos foram contados (Countess II, Life Technologies, EUA). Em seguida, as células foram coradas com o mix anticorpos por 30 min. As células foram então lavadas com PBS e fixadas com tampão de permeabilidade (Bioscience) por 30 min. Em seguida, foram coradas com uma nova combinação de anticorpos para moléculas intracelulares, lavadas com PBS 1x e ressuspendidas em 200  $\mu$ L de PBS 1x. As células foram adquiridas em citômetro FACSymphony (BD Biosciences, San Jose, USA) e analisadas com o software FlowJo (Tree Star, Ashlan, OR). As amostras foram marcadas com os seguintes anticorpos: CD4-BUV395 (clone GK1.5, 1:800), CD8-BUV805 (clone 53-6.7, 1:400), FOXP3-AF700 (clone MF-14, 1:100), TNF-BV786 (clone MP6-XT22, 1:100), IFN-PECF (clone XMG1.2, 1:50), IL-4-BV711 (clone 11B11, 1:50), IL-10-BV421 (clone JES5, 1:100), Viabilidade-eFluor450 (65-0863-18, 1:1000), CD45- PECEY (clone 30-F11, 1:800), LY6G-BUV563 (clone 1A8, 1:500), CD11b-BB700 (clone: M1/70, 1:400), TCR $\gamma\delta$ -SB600 (118124, 1:400), LY6C-PE (clone AL-21, 1:800), F4/80-PERCP (clone BM8, 1:800), MHC II-RB744 (clone: M5/114, 1:200), CCR2-AF467 (clone SA203G11, 1:200), CX3CR1-BV650 (clone SA011F11, 1:200), IL-17-BV510 (1:50) e CD3-FITC (clone 17A2, 1:200).

#### 4.15 Análise e Processamento dos Dados de Citometria de Fluxo

Para a análise funcional das populações celulares por citometria de fluxo, quando aplicável, utilizou-se a Intensidade Média de Fluorescência Integrada (IMFI, do inglês *Integrated Mean Fluorescence Intensity*), calculada como o produto entre a frequência de células positivas (%) e a intensidade média de fluorescência (MFI). O uso da IMFI é vantajoso, reunindo, em uma única métrica, tanto a proporção de células que expressam determinado marcador quanto o nível de sua expressão, proporcionando uma avaliação mais abrangente. Quando a avaliação por IMFI não foi viável, geralmente devido à baixa porcentagem de células em algumas populações (especialmente em células mielóides cardíacas), a análise foi realizada utilizando-se apenas a MFI.

Para a análise multidimensional dos dados, os eventos de cada animal foram inicialmente concatenados de acordo com o grupo experimental. Esses arquivos foram então utilizados como entrada para o algoritmo Cytofkit2 no ambiente RStudio (Chen et al., 2016). Essa ferramenta permite uma análise imparcial de redução de dimensionalidade através do t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE), além da geração de heatmaps baseados na expressão de marcadores celulares e de ativação (Belkina et al., 2019). A identificação dos agrupamentos celulares ou “clusters” foi conduzida por meio dos algoritmos FlowSOM e RphenoGraph (Levine et al., 2015; Quintelier et al., 2021), permitindo uma análise não supervisionada das populações imunológicas.

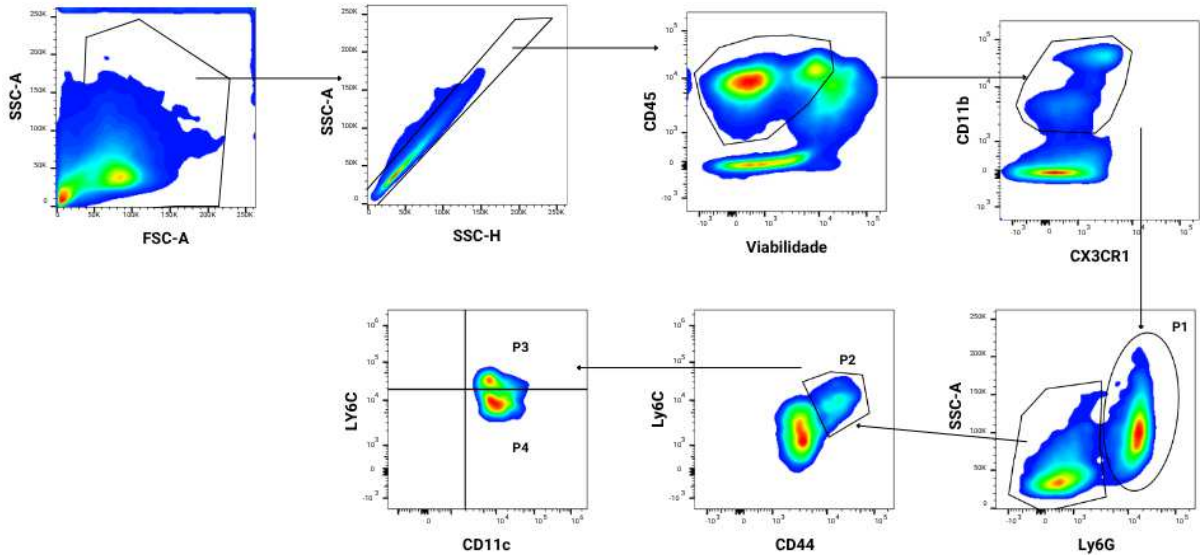
Como estratégia de análise das populações de células linfóides do baço (Figura 9), as células foram inicialmente selecionadas com base em seus parâmetros de dispersão de luz, utilizando um gate na população de interesse conforme o tamanho celular (Forward Scatter - FSC-A) versus granulosidade (Side Scatter - SSC-A), para excluir debris e células mortas. Em seguida, foi realizada a discriminação de doublets por meio da análise da correlação entre a área (A) e a altura (H) do sinal de SSC (SSC-A vs. SSC-H), selecionando-se apenas os eventos singletes. A partir da população de células únicas, realizou-se a seleção de células viáveis, excluindo-se os eventos positivos para o marcador de viabilidade. Dentro da população de células viáveis, foram identificados os linfócitos T auxiliares (P1), pela expressão de CD4, e os linfócitos T citotóxicos (P2), pela expressão de CD8. Finalmente, a expressão de citocinas intracelulares, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , foi analisada dentro de cada uma dessas subpopulações de linfócitos T (P1 e P2).



**Figura 9: Estratégia de análise de populações linfoides do baço.** As células de interesse foram inicialmente selecionadas com base nos parâmetros de tamanho (Forward Scatter - FSC-A) e granularidade (Side Scatter - SSC-A). Em seguida, realizou-se a discriminação de doublets para selecionar eventos de células únicas (singletes) com base na correlação entre a altura (SSC-H) e a área (SSC-A). As células vivas foram selecionadas conforme o marcador de viabilidade. Na população de células vivas e singletes, os linfócitos T foram identificados e separados em subpopulações T auxiliares (CD4<sup>+</sup>, gate P1) e T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>, gate P2). A expressão de citocinas intracelulares foi avaliada dentro das populações previamente definidas.

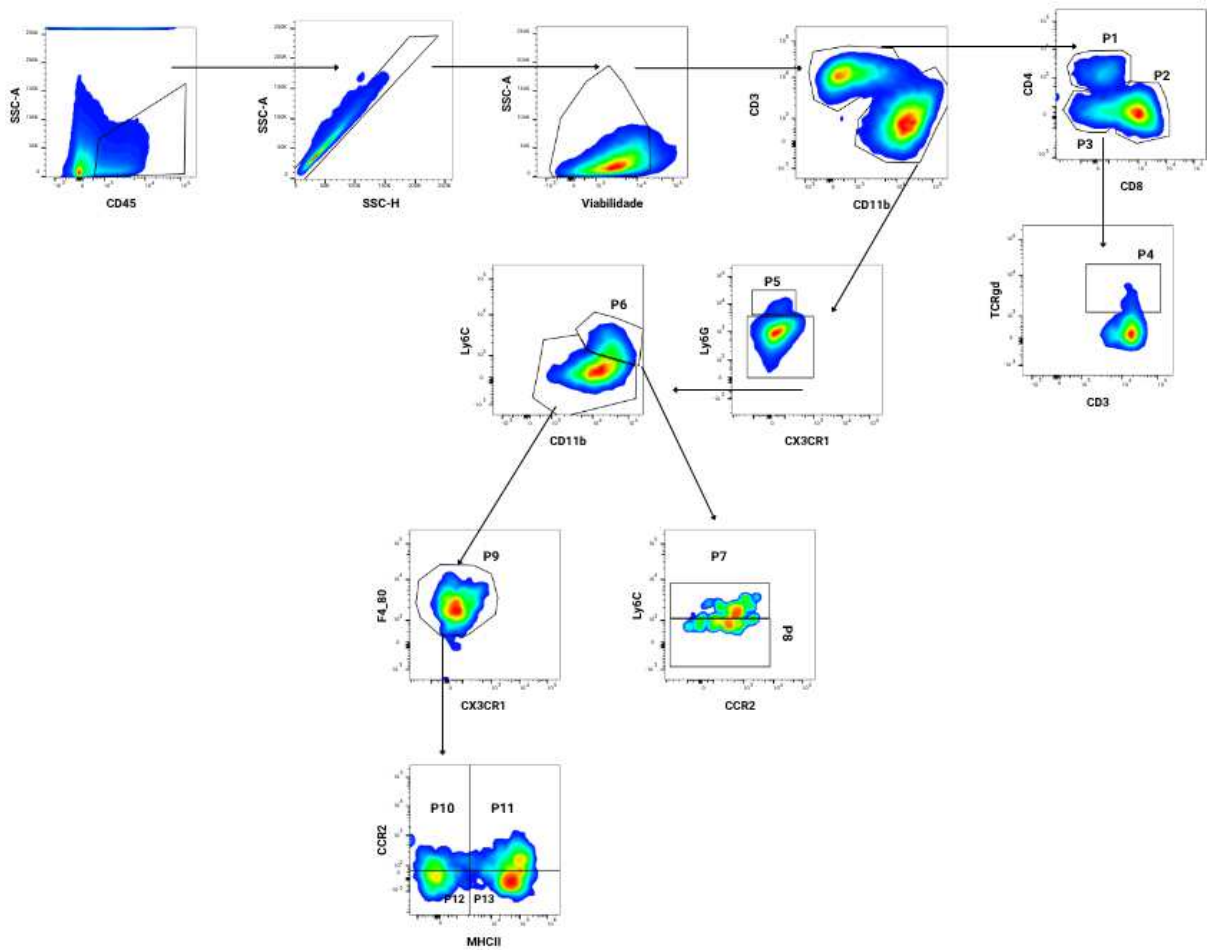
Para a análise das populações mieloides no baço (Figura 10), as células foram inicialmente selecionadas com base em seus parâmetros de tamanho (FSC-A) e granularidade (SSC-A), seguida pela discriminação de doublets (SSC-A vs. SSC-H) e pela seleção de células viáveis e leucócitos (CD45<sup>+</sup>). A partir desta população, as células mieloides foram identificadas pela expressão de CD11b. Dentro do gate de células CD11b<sup>+</sup>, os neutrófilos foram identificados pela expressão de Ly6G (P1). As células Ly6G<sup>-</sup> foram então analisadas quanto à expressão de CD44 e Ly6C, onde a população de monócitos (P2) foi selecionada. A

partir do gate P2, foram identificados os monócitos clássicos (P3: Ly6C<sup>high</sup>) e os monócitos não clássicos (P4: Ly6C<sup>low</sup>) com base na expressão diferencial de Ly6C e CD11c.



**Figura 10: Estratégia de análise de populações mieloides do baço.** As células de interesse selecionadas sequencialmente com base em seus parâmetros de dispersão de luz (FSC-A vs. SSC-A), discriminação de doublets (SSC-A vs. SSC-H) e identificação de leucócitos viáveis (Viabilidade<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>). A partir dos leucócitos viáveis, as células CD11b<sup>+</sup> foram selecionadas. Dentro desta população, foram identificados: P1: Neutrófilos, como células Ly6G<sup>+</sup>. P2: População de monócitos, selecionada a partir de células Ly6G<sup>-</sup> com base na expressão de CD44 e Ly6C. P3: Monócitos clássicos, identificados como células Ly6C<sup>high</sup> a partir do gate P2. P4: Monócitos não clássicos, identificados como células Ly6C<sup>low</sup> a partir do gate P2.

Para a estratégia de análise das populações imunes no tecido cardíaco (Figura 11), inicialmente, os leucócitos (CD45<sup>+</sup>) foram selecionados a partir de um gate nos parâmetros de dispersão de luz (FSC-A vs. SSC-A). Em seguida, realizou-se a discriminação de doublets (SSC-A vs. SSC-H) e a seleção de células viáveis. A partir dessa seleção, foram distinguidas as linhagens linfóide (CD3<sup>+</sup>) e mielóide (CD11b<sup>+</sup>). Dentro da população linfóide, foram identificados os linfócitos T auxiliares (P1: CD4<sup>+</sup>), T citotóxicos (P2: CD8<sup>+</sup>) e T duplo-negativos (P3: CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). Além disso, dentro dessas populações, identificadas as células T gama-delta (P4: TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>). A caracterização da população mielóide (CD11b<sup>+</sup>) iniciou-se com a identificação dos neutrófilos (P5: Ly6G<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-</sup>). As células Ly6G<sup>-</sup> foram então analisadas para identificar os monócitos (P6: Ly6C<sup>+</sup>). Esta população de monócitos foi posteriormente dividida em monócitos clássicos (P7: Ly6C<sup>high</sup>CCR2<sup>+</sup>) e não clássicos (P8: Ly6C<sup>low</sup>CCR2<sup>-</sup>). Posteriormente, a população CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> foi utilizada para identificar os macrófagos (P9: F4/80<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>). As subpopulações de macrófagos (P9) foram identificadas com base na expressão de MHCII e CCR2 em quatro subpopulações distintas (P10: MHCII<sup>-</sup>CCR2<sup>-</sup>, P11: MHCII<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup>, P12: MHCII<sup>-</sup>CCR2<sup>+</sup>, e P13: MHCII<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>).



**Figura 11: Estratégia de análise de populações celulares do coração.** Estratégia de análise de populações celulares do coração, na qual as células foram selecionadas sequencialmente com base na expressão de CD45 e nos parâmetros de dispersão de luz (FSC/SSC), seguida pela discriminação de doublets e pela seleção de leucócitos viáveis. A partir desta população, as células foram separadas nas linhagens linfóide (CD3<sup>+</sup>) e mieloide (CD11b<sup>+</sup>). Na linhagem linfóide, foram identificados os linfócitos T auxiliares (P1: CD4<sup>+</sup>), T citotóxicos (P2: CD8<sup>+</sup>), T duplo-negativos (P3: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) e as células T gama-delta (P4: TCRγδ<sup>+</sup>). Para a caracterização da linhagem mieloide, os neutrófilos (P5: Ly6G<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-</sup>) foram primeiramente identificados a partir do gate de células CD11b<sup>+</sup>. A população restante (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>) foi então utilizada para análises paralelas de monócitos e macrófagos. Os monócitos foram identificados como células Ly6C<sup>+</sup> (P6) e subsequentemente divididos em clássicos (P7: Ly6C<sup>high</sup> CCR2<sup>+</sup>) e não clássicos (P8: Ly6C<sup>low</sup> CCR2<sup>-</sup>). A partir da mesma população CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>, os macrófagos (P9: F4/80<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>) foram identificados e, em seguida, sub-clusterizados com base na expressão de MHCII e CCR2 (populações P10 a P13).

#### 4.16 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 9.3.1 (GraphPad Inc, EUA) ou o software R (versão 4.3.1). Inicialmente realizou-se o teste de Shapiro-Wilk para determinação da distribuição dos dados e o teste de Grubbs para avaliar a presença de outliers. Para análise entre dois grupos foram utilizados o Test T de Student ou Mann-Whitney.

Já para análises entre três ou mais grupos, os testes One-way ANOVA ou two-way ANOVA seguidos do pós-teste de Tukey. Foram considerados resultados significativos quando o valor de  $p \leq 0,05$ .

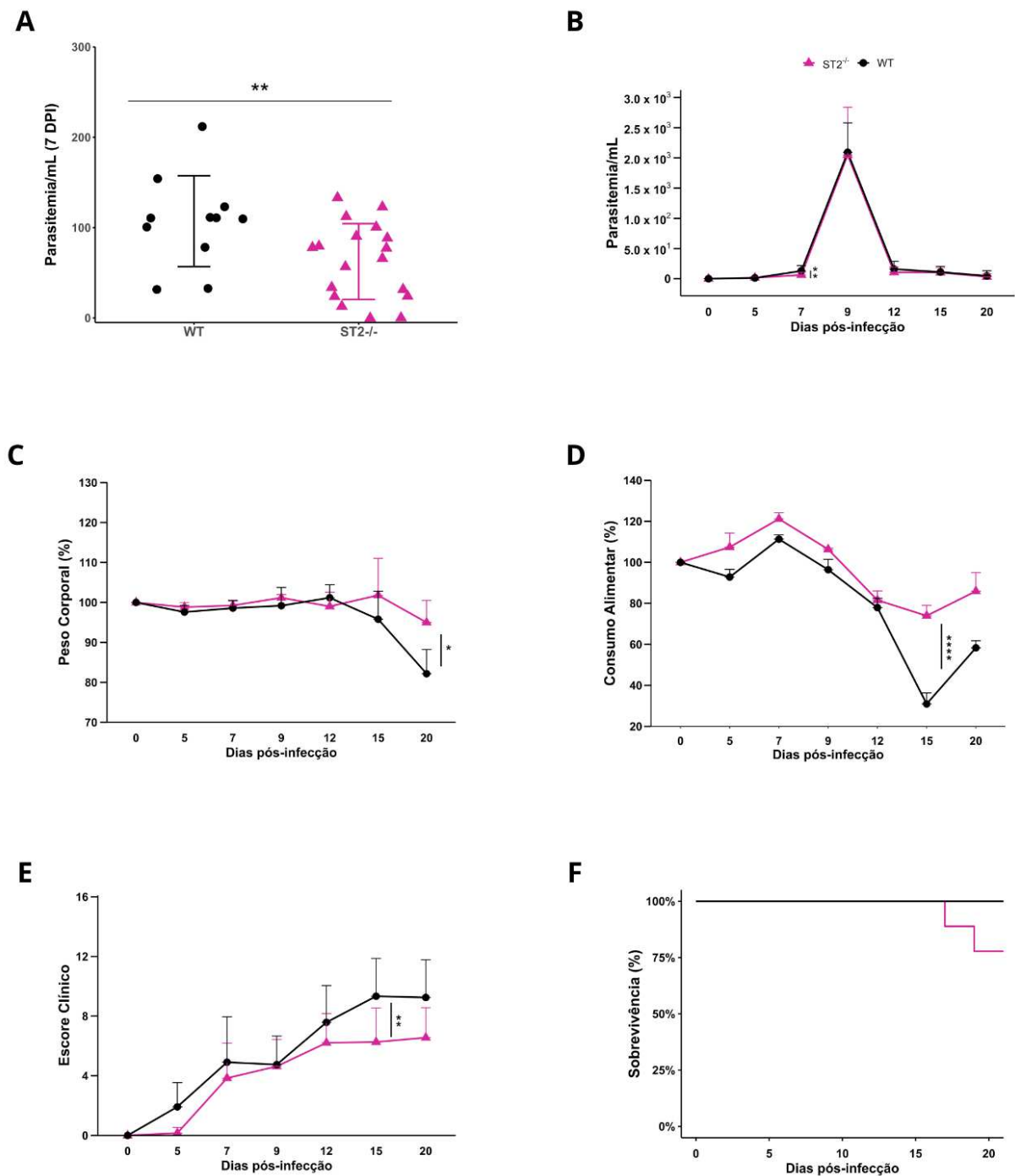
## 5 RESULTADOS

### 5.1 O eixo IL-33/ST2 no curso da infecção experimental por *T. cruzi*

Para investigar o papel do receptor ST2 no curso da infecção experimental aguda por *T. cruzi*, a parasitemia, escore clínico, sobrevida, perda de peso e consumo alimentar foram avaliados em camundongos WT e ST2<sup>-/-</sup> após infecção com 1000 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y. Nossos achados mostram que no 7 dpi, os camundongos ST2<sup>-/-</sup> exibiram uma redução no número de parasitos circulantes em comparação com o grupo WT (Figura 12A). No entanto, os níveis de parasitemia entre os grupos convergiram no 9 dpi, e ambos os grupos apresentaram cinéticas de parasitemia semelhantes subsequentemente, com pico no 9 dpi seguido de uma rápida redução (Figura 12B).

As alterações clínicas começaram a ser observadas a partir do 15 dpi. Os camundongos WT infectados apresentaram uma redução acentuada no peso corporal (Figura 12C) e no consumo alimentar (Figura 12D) entre os dias 15 e 20 dpi. Paralelamente, foi observada uma piora no estado geral dos animais, evidenciada pelo aumento do escore clínico (Figura 12E). Em contraste, os camundongos ST2<sup>-/-</sup> infectados demonstraram uma perda de peso menos pronunciada (Figura 12C), além de um consumo alimentar mais sustentado (Figura 12D) ao longo da infecção.

Em relação à sobrevida, enquanto todos os animais WT infectados sobreviveram durante o período analisado, o grupo ST2<sup>-/-</sup> infectado apresentou mortalidade com início no 17 dpi (Figura 12F).

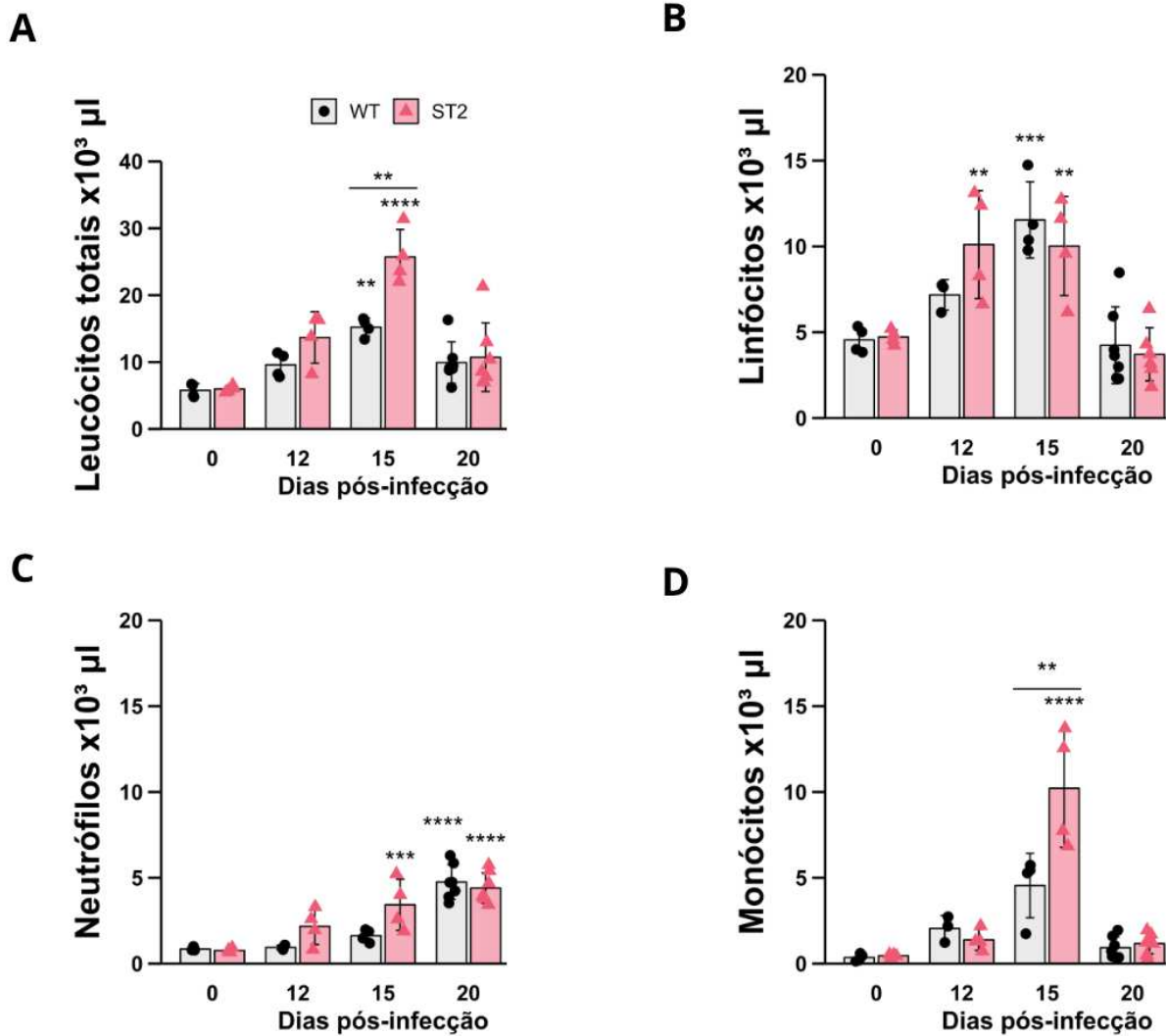


**Figura 12: O papel do eixo IL-33/ST2 no curso da infecção experimental por *T. cruzi*.** (A) Número de parasitas por mL no sétimo dia pós-infecção em camundongos BALB/c WT e ST2<sup>-/-</sup> infectados. (B) Cinética de parasitas por mL de sangue em camundongos BALB/c WT e ST2<sup>-/-</sup> infectados. (C) Mudanças percentuais no peso corporal de camundongos BALB/c WT e ST2<sup>-/-</sup> infectados. (D) Mudanças percentuais na ingestão alimentar ao longo da infecção. Cada ponto de dados representa a ingestão de alimentos em duas gaiolas (n=3 camundongos por gaiola) (Sinton *et al.*, 2023). (E) Comparação de escores clínicos entre camundongos BALB/c WT e ST2<sup>-/-</sup> infectados. (F) Sobrevida dos camundongos BALB/c WT e ST2<sup>-/-</sup> infectados. Os dados são expressos como médias ± DP (n mínimo = 8) de dois experimentos independentes. Resultados considerados significantes com \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, e \*\*\*\*p < 0,0001. Os dados de séries temporais foram analisados usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

## 5.2 Perfil da resposta imune celular sistêmica induzida pela infecção por *T. cruzi* em camundongos BALB/c WT e ST2<sup>-/-</sup>

Com o objetivo de compreender melhor as alterações observadas durante o curso da infecção por *T. cruzi*, e entender aspectos sistêmicos da infecção por *T. cruzi* na ausência e presença do receptor ST2, foi avaliado o perfil leucocitário no sangue periférico ao longo da infecção (Figura 13). Em ambos os grupos de animais infectados, diferenças no número de leucócitos circulantes tornaram-se evidentes após o 12 dpi. Nos grupos infectados, observou-se um pico de leucócitos totais no 15 dpi, sendo maior nos camundongos ST2<sup>-/-</sup> infectados, em comparação tanto aos seus controles não infectados quanto aos camundongos WT infectados (Figura 13A).

Na análise das subpopulações celulares, verificamos a presença de linfócitos, neutrófilos e monócitos circulantes. Embora o número absoluto de linfócitos e neutrófilos tenha aumentado durante o 15 dpi, não foram detectadas diferenças entre os grupos infectados (Figura 13B-C). Por outro lado, os monócitos foram os principais responsáveis pelo pico de leucócitos totais observado nos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados, com um aumento superior tanto ao observado nos WT infectados quanto nos respectivos controles não infectados (Figura 13D). No 20 dpi, o número de leucócitos totais diminuiu em ambos os grupos, sugerindo um possível recrutamento celular para os tecidos (Figura 13A)

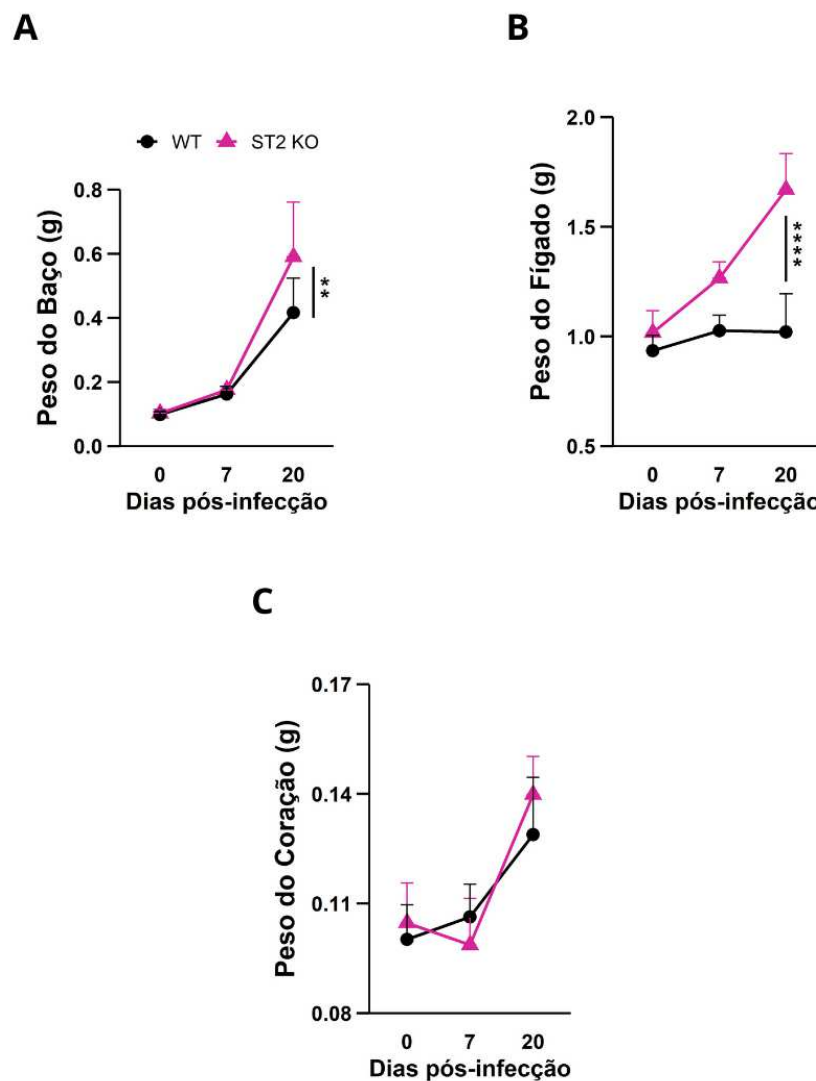


**Figura 13: Leucograma de camundongos BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Número de leucócitos totais. (B) Número de linfócitos totais. (C) Número de neutrófilos totais. (D) Número de monócitos totais. Para o leucograma, as análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado (0 dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre os dois grupos no mesmo momento da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP (n 4 - 7 animais por grupo). Resultados considerados significantes com \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Dados analisados usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

### 5.3 O eixo IL-33/ST2 regula o desenvolvimento de hepatoesplenomegalia durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*

Tendo estabelecido aspectos do papel do eixo IL-33/ST2 no curso da infecção e na dinâmica de leucócitos circulantes, seguimos com a avaliação da infecção sobre os órgãos-alvo. O peso do fígado, baço e coração dos camundongos foi analisado durante a fase aguda da infecção (Figura 14).

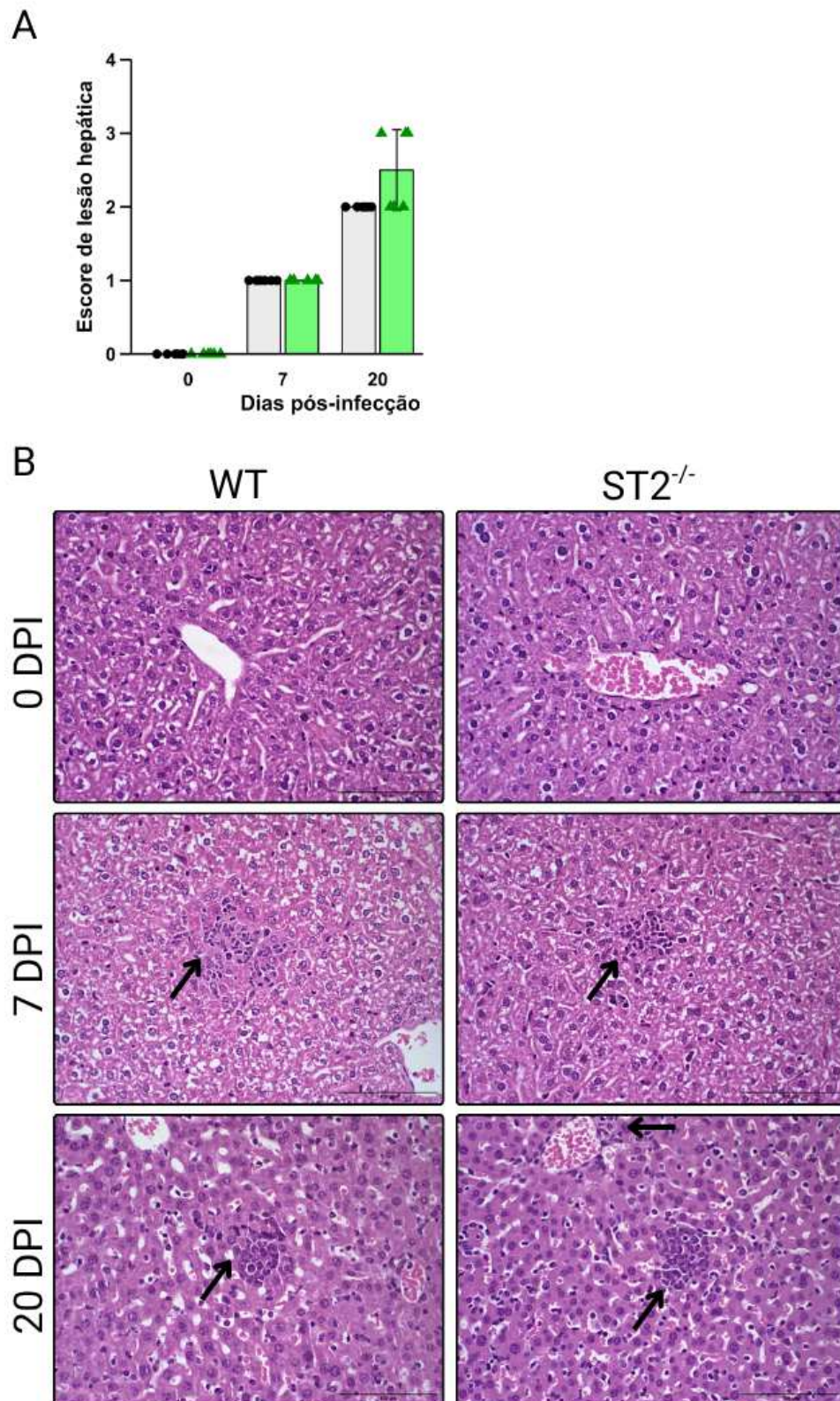
No 20 dpi, observamos um aumento acentuado no peso do baço de camundongos  $ST2^{-/-}$  infectados em comparação aos camundongos WT infectados (Figura 14A). De forma semelhante, a ausência do receptor ST2 resultou em hepatomegalia significativa nos animais infectados, evidenciada pelo aumento do peso do fígado no mesmo período de tempo (Figura 14B). Por outro lado, não foram detectadas diferenças significativas no peso do coração entre os grupos infectados, apenas entre seus respectivos controles (dados não mostrados) (Figura 14C).



**Figura 14: Peso de órgãos-alvo em camundongos BALB/c e  $ST2^{-/-}$ , infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Peso total do baço de camundongos BALB/c selvagens e  $ST2^{-/-}$ , infectados ou não com *T. cruzi*. (B) Peso total do fígado de camundongos BALB/c selvagens e  $ST2^{-/-}$ , infectados ou não com *T. cruzi*. (C) Peso total do coração de camundongos BALB/c selvagens e  $ST2^{-/-}$ , infectados ou não com *T. cruzi*. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP (n 3-7 animais) representativos de um experimento. Resultados considerados significantes com \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Os dados de séries temporais foram analisados usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

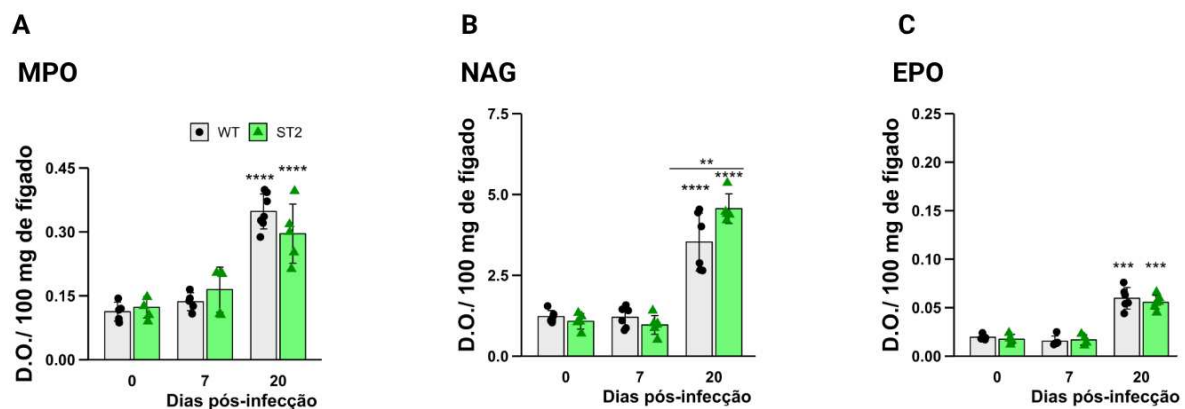
#### **5.4 O eixo IL-33/ST2 na regulação do perfil inflamatório hepático durante a infecção por *T. cruzi***

Considerando a acentuada hepatomegalia observada nos animais ST2<sup>-/-</sup>, investigamos o impacto da ausência deste receptor no desenvolvimento de alterações hepáticas após a infecção com *T. cruzi* (Figura 15). A análise histopatológica do fígado permitiu avaliar a presença e a intensidade do infiltrado inflamatório no parênquima hepático (Figura 15B). Na análise semiquantitativa do fígado, identificada por meio de um escore de inflamação, foi observado um aumento progressivo da inflamação tecidual nos animais WT e ST2<sup>-/-</sup> infectados ao longo do tempo. No entanto, não houve diferença no escore entre os grupos de animais infectados no mesmo tempo experimental (Figura 15A). A avaliação histopatológica do parênquima hepático dos camundongos infectados revelou a presença de infiltrado inflamatório difuso e multifocal, constituído predominantemente por células mononucleares (Figura 15B).



**Figura 15: Avaliação da inflamação hepática de camundongos BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. (A) Escore histopatológico de lesão hepática. (B) Imagens representativas da histologia do fígado corada por H&E. Flechas representam áreas de infiltrado inflamatório. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP representativos de um experimento.**

No que se refere às características do infiltrado inflamatório hepático, as dosagens da atividade de MPO, NAG e EPO foram realizadas para avaliar indiretamente a presença de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, respectivamente (Figura 16). A atividade da MPO (neutrófilos) aumentou progressivamente com a infecção, atingindo o pico no 20 dpi. Neste momento, ambos os grupos infectados apresentaram níveis de MPO elevados em relação aos seus respectivos controles não infectados, porém, não foram observadas diferenças entre os grupos infectados (Figura 16A). Em relação à atividade de macrófagos (NAG), também observamos uma elevação no 20 dpi, porém, em maiores níveis para os animais ST2<sup>-/-</sup> em relação aos WT infectados (Figura 16B). Para a atividade de eosinófilos (EPO), observamos um perfil semelhante ao da MPO, com aumento significativo no 20 dpi para ambos os grupos infectados em comparação com seus respectivos controles não infectados, mas sem diferenças significativas entre grupos infectados (Figura 16C).

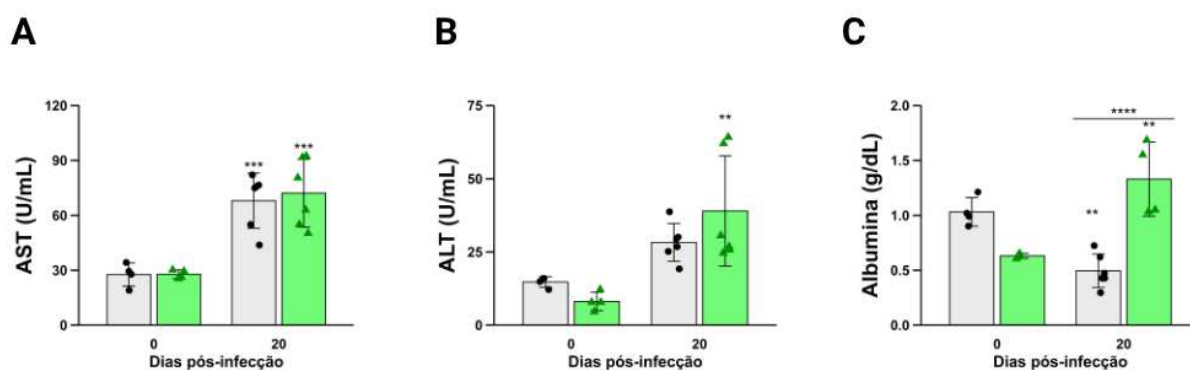


**Figura 16: Perfil de atividade celular no fígado de camundongos BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Atividade indireta de neutrófilos (MPO) de camundongos BALB/c selvagens e ST2<sup>-/-</sup>, infectados ou não com *T. cruzi*. (B) Atividade indireta de macrófagos (NAG) de camundongos BALB/c selvagens e ST2<sup>-/-</sup>, infectados ou não com *T. cruzi*. (C) Atividade indireta de eosinófilos (EPO) de camundongos BALB/c selvagens e ST2<sup>-/-</sup>, infectados ou não com *T. cruzi*. Os dados são expressos como médias ± DP representativos de um experimento. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado (0 dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre os grupos no mesmo momento da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Os dados são expressos como médias ± DP (n 4 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, e \*\*\*\*p < 0,0001. Dados analisados usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

### 5.5 A deficiência no receptor ST2 prejudica a função hepática em camundongos infectados com *T. cruzi*

Para compreender as consequências da inflamação do fígado e avaliar a função hepática, monitoramos as concentrações séricas de marcadores bioquímicos indicativos de

lesão nos hepatócitos (Figura 17). Observou-se um aumento nos níveis de aspartato aminotransferase (AST), aos 20 dpi para os animais infectados em relação aos seus respectivos controles não infectados, porém, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos infectados (Figura 17A). Já em relação aos níveis de alanina aminotransferase (ALT), verificou-se um aumento apenas nos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados quando comparados aos seus respectivos controles não infectados (Figura 17B). Aos 20 dpi, observou-se um aumento significativo nos níveis de albumina nos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados, tanto em relação aos seus respectivos controles não infectados quanto aos animais WT infectados. Em contraste, os animais selvagens infectados apresentaram uma redução significativa nos níveis de albumina em comparação aos seus controles (Figura 17C).

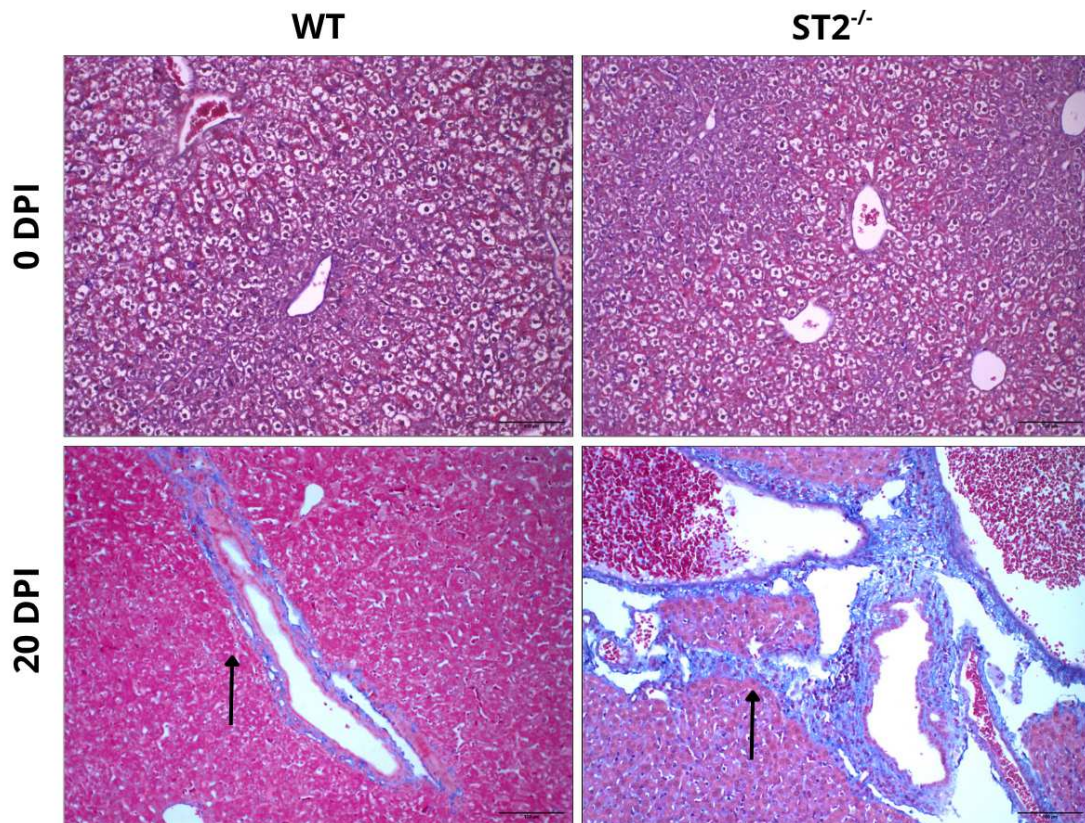


**Figura 17: Avaliação bioquímica de camundongos BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST). (B) Níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT). (C) Níveis séricos de albumina. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado (0 dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre os dois grupos no mesmo momento da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Os dados são expressos como médias ± DP (n 3 - 7 animais). Resultados considerados significantes com \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, e \*\*\*\*p < 0,0001. Dados analisados usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

## 5.6 O eixo IL-33/ST2 regula o desenvolvimento de fibrose hepática em camundongos infectados com *T. cruzi*

Para investigar o impacto da deficiência do receptor ST2 no desenvolvimento de fibrose hepática durante a infecção aguda por *T. cruzi*, cortes histológicos de fígado de camundongos WT e ST2<sup>-/-</sup> infectados foram submetidos à coloração pelo Tricrômico de Masson para evidenciar a deposição de colágeno (Figura 18). Nos animais WT infectados, observou-se uma deposição de colágeno discreta, predominantemente restrita às áreas periportais e perivasculares. Em contraste, os fígados dos camundongos ST2<sup>-/-</sup> infectados

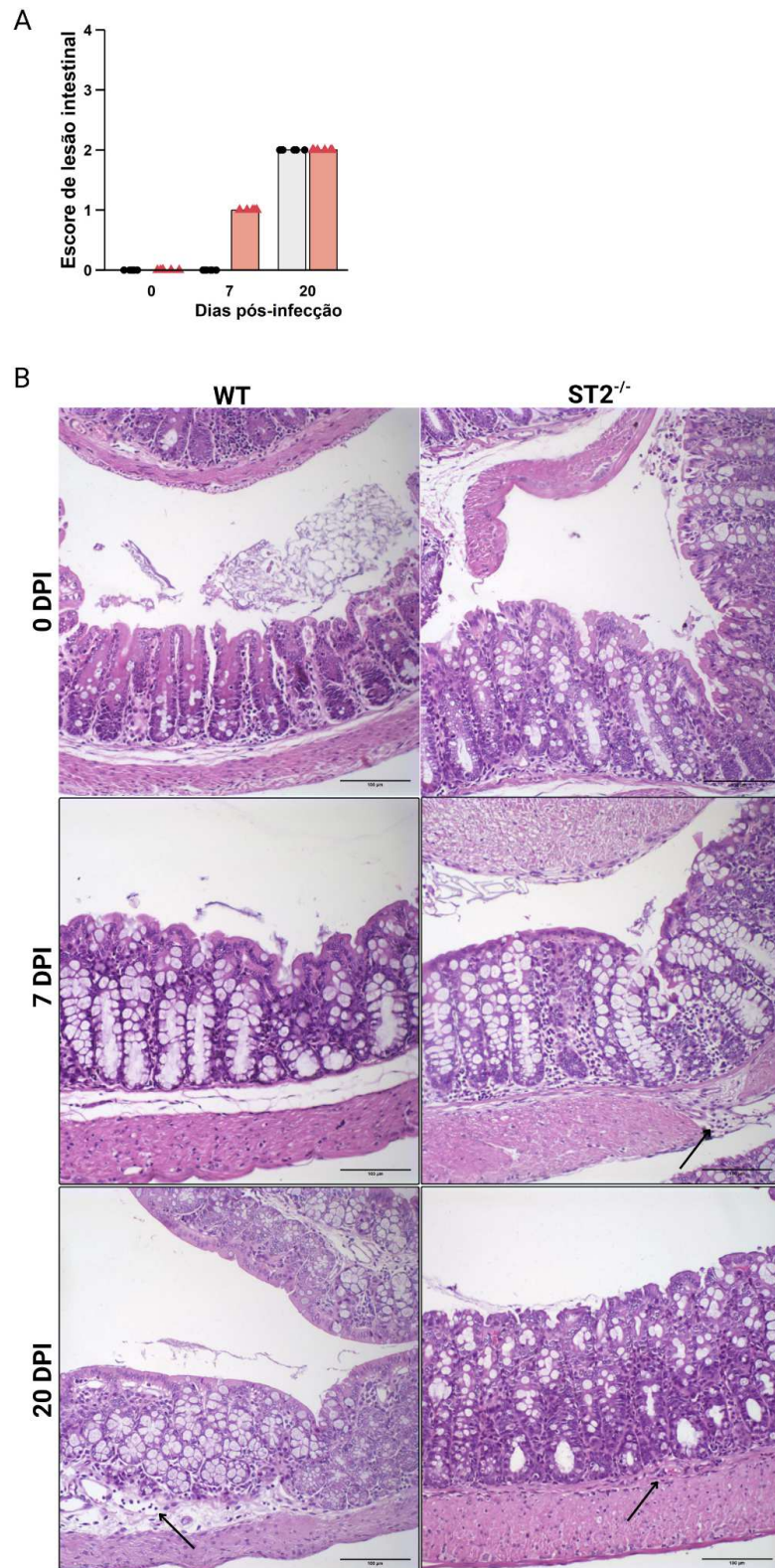
apresentaram uma deposição de colágeno não apenas nas regiões periportais, mas também em perfil expandido no parênquima hepático, com formação de septos fibrosos mais espessos.



**Figura 18:** Análise histológica do desenvolvimento de fibrose hepática em camundongos BALB/c e  $ST2^{-/-}$ , infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Análise da deposição de colágeno pela coloração pelo Tricrômico de Masson. As imagens são representativas de cada grupo experimental. As setas indicam áreas de deposição de colágeno.

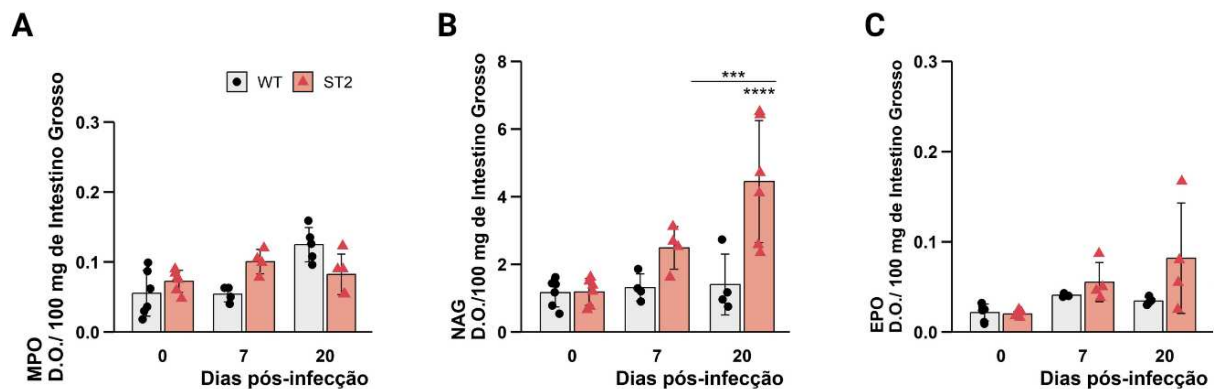
### 5.7 A deficiência no receptor ST2 potencializa a inflamação intestinal em camundongos infectados com *T. cruzi*

A análise histopatológica semiquantitativa do cólon revelou a progressão do grau de inflamação intestinal durante a infecção (Figura 19A). Os camundongos selvagens ou deficientes para o receptor ST2 não infectados exibiram aspectos morfológicos da parede intestinal condizentes com a normalidade. No 7 dpi, enquanto não foram detectadas alterações patológicas para os animais selvagens infectados, animais  $ST2^{-/-}$  apresentaram maior lesão no intestino grosso, com o desenvolvimento de infiltrado inflamatório na região da muscular e submucosa. No 20 dpi, observamos infiltrados inflamatórios de intensidade e escore similar para ambas os grupos infectados, localizados principalmente na submucosa (Figura 19B).



**Figura 19: Caracterização da inflamação intestinal de camundongos BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. A) Escore histopatológico de lesão intestinal. (B) Imagens representativas da histologia do intestino grosso corada por H&E. Flechas representam áreas de infiltrado inflamatório. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP representativos de um experimento.**

Para avaliar as características da inflamação, foi realizada a determinação da atividade de MPO, NAG e EPO no intestino grosso (Figura 20). Os dados demonstraram que a infecção por *T. cruzi* não induz aumento da atividade de MPO no intestino grosso de nenhum dos grupos avaliados (Figura 20A). Em relação à atividade de macrófagos, verificou-se que apenas os camundongos ST2<sup>-/-</sup> infectados apresentaram um aumento na atividade desta enzima no 20 dpi. Neste ponto, os níveis de NAG nos animais deficientes para o receptor ST2 e infectados foram superiores tanto aos observados nos seus respectivos controles não infectados quanto nos animais WT infectados (Figura 20B). Não foram observadas diferenças na atividade de EPO entre os grupos infectados (Figura 20C).

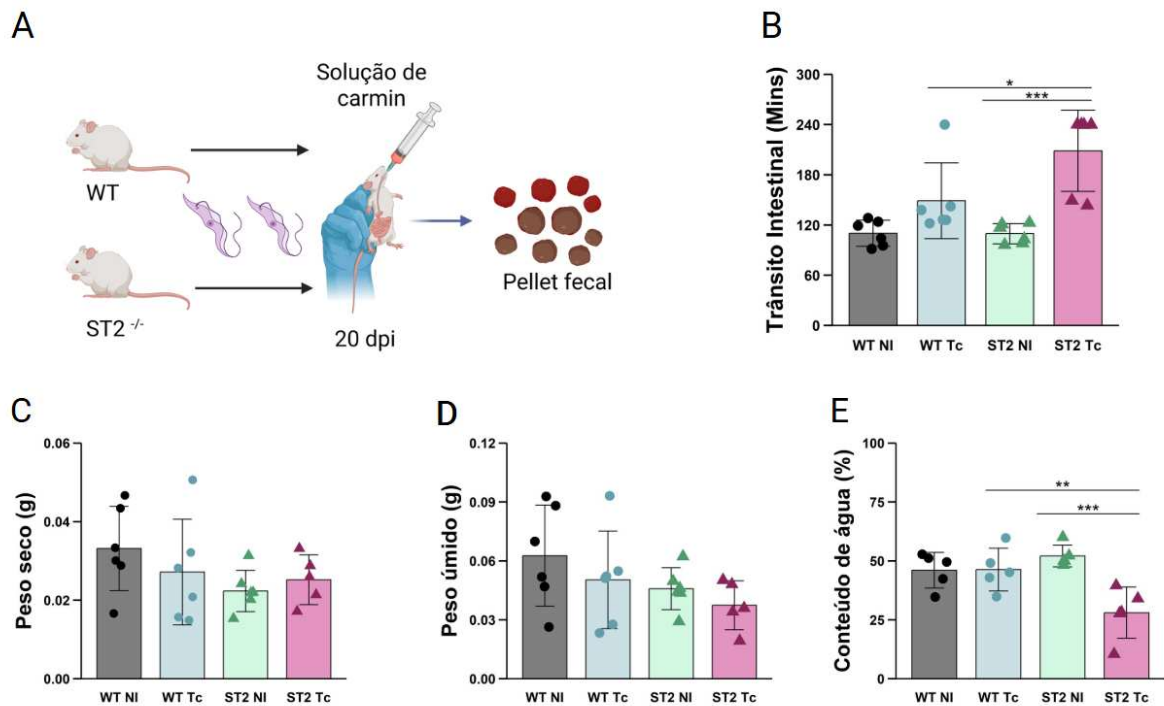


**Figura 20: Perfil de atividade celular no intestino grosso de camundongos BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Atividade indireta de neutrófilos (MPO) de camundongos BALB/c selvagens e ST2<sup>-/-</sup>, infectados ou não com *T. cruzi*. (B) Atividade indireta de macrófagos (NAG) de camundongos BALB/c selvagens e ST2<sup>-/-</sup>, infectados ou não com *T. cruzi*. (C) Atividade indireta de eosinófilos (EPO) de camundongos BALB/c selvagens e ST2<sup>-/-</sup>, infectados ou não com *T. cruzi*. Os dados são expressos como médias ± DP representativos de um experimento. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado (0 dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre os grupos no mesmo momento da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Os dados são expressos como médias ± DP (n 4 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, e \*\*\*\*p < 0,0001. Dados analisados usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

## 5.8 Camundongos ST2<sup>-/-</sup> apresentam alterações na função intestinal e parâmetros fecais durante a infecção aguda por *T. cruzi*

Para avaliar a disfunção intestinal causada pela infecção por *T. cruzi*, avaliou-se motilidade intestinal por meio do ensaio com o corante carmin vermelho no 20 dpi (Figura 21A). Foi observado um aumento no tempo em minutos para a primeira excreção do *pellet* fecal contendo o corante carmin vermelho nos camundongos ST2<sup>-/-</sup> infectados, quando comparados aos seus respectivos controles não infectados e também em relação aos animais

WT infectados, indicando uma diminuição da peristalse do trato gastrointestinal para esse grupo infectado (Figura 21B). Na análise dos parâmetros fecais, os dados demonstraram que a infecção por *T. cruzi* não altera o peso fecal úmido ou seco em nenhum dos grupos (Figuras 21C-D). No entanto, verificou-se que a infecção induz uma redução significativa no conteúdo de água fecal apenas nos camundongos ST2<sup>-/-</sup>, tanto em relação aos seus controles não infectados quanto aos animais selvagens infectados (Figura 21E).



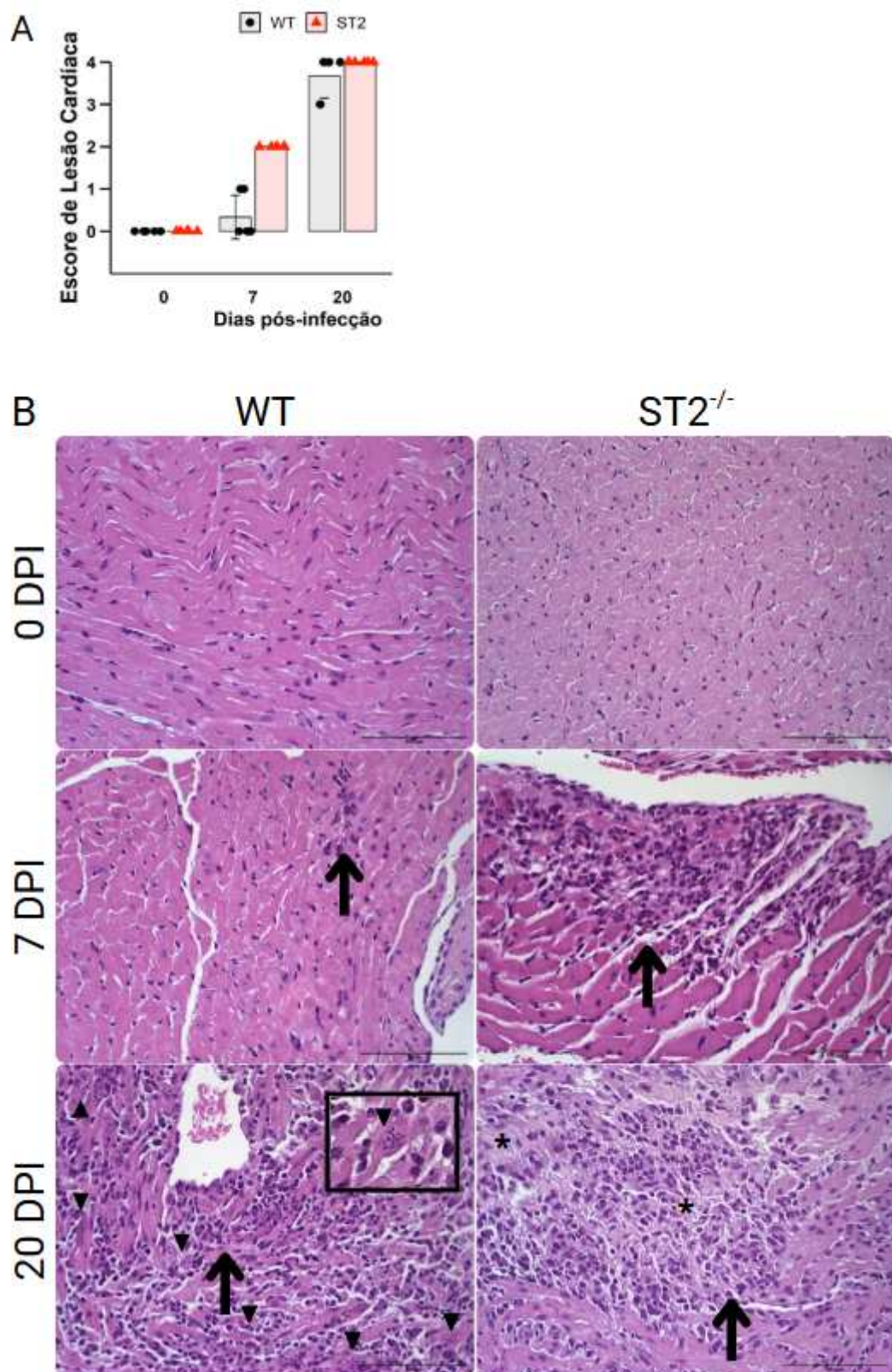
**Figura 21: Avaliação da função intestinal de camundongos BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Representação esquemática do ensaio de trânsito intestinal com o corante carmin vermelho. (B) Tempo de trânsito intestinal total (minutos). (C) Peso seco fecal (g). (D) Peso úmido fecal (g). (E) Conteúdo percentual de água nas fezes (%). As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado (0 dpi), e entre os grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias ± DP (n 4 - 7 animais). Resultados considerados significantes com \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,0001. Dados analisados usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

### 5.9 A ausência do receptor ST2 induz miocardite precoce na infecção experimental por *T. cruzi* em camundongos BALB/c

A avaliação por meio da análise histopatológica do tecido cardíaco possibilitou avaliar a progressão da miocardite chagásica nos animais selvagens e ST2<sup>-/-</sup> (Figura 22). No 7 dpi, observamos a presença de leves focos inflamatórios no coração dos animais selvagens infectados, com alguns animais apresentando escore 0 devido à ausência de alterações

inflamatórias (Figura 22A). Em contraste, para os animais  $ST2^{-/-}$ , observamos o desenvolvimento de miocardite precoce já no 7 dpi, com o aparecimento de áreas com extenso e difuso infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 22B).

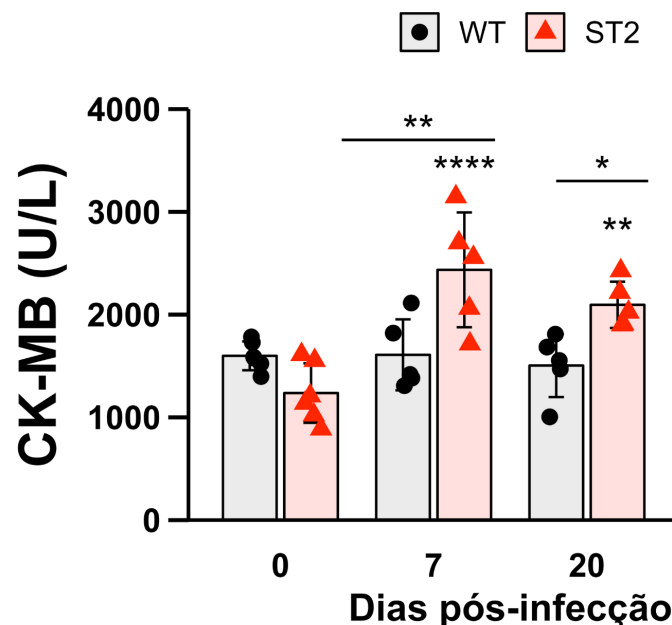
Na avaliação do tecido cardíaco dos camundongos WT e  $ST2^{-/-}$  infectados no 20 dpi, foi observado um infiltrado inflamatório caracterizado principalmente por linfócitos e macrófagos, com celularidade semelhante entre os grupos infectados. No entanto, enquanto para os animais WT observamos a presença de numerosos ninhos de amastigotas no tecido (Figura 22B, em destaque), nos animais  $ST2^{-/-}$  identificamos alterações degenerativas entre os cardiomiócitos, sugerindo intenso dano às fibras cardíacas. Para estes animais, ninhos de amastigotas foram detectados, porém de maneira mais discreta em relação ao grupo selvagem (Figura 22B).



**Figura 22: Análise histológica cardíaca de camundongos BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. (A) Escore histopatológico de lesão cardíaca. (B) Imagens representativas da histologia do coração corada por H&E. Flechas representam áreas de infiltrado inflamatório. Os dados são expressos como médias ± DP representativos de um experimento.**

### 5.10 A deficiência no receptor ST2 potencializa o dano cardíaco agudo causado pela infecção por *T. cruzi* em camundongos BALB/c

Para avaliar a intensidade do dano cardíaco, examinamos os níveis séricos de CK-MB nos camundongos WT e ST2<sup>-/-</sup> infectados ou não com *T. cruzi* (Figura 23). Desse modo, tanto no 7 quanto no 20 dpi, foram observados maiores níveis de CK-MB nos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados, quando comparados com seu grupo controle e com os animais WT infectados. Esses achados corroboram com os resultados da análise histológica, que demonstram o desenvolvimento de miocardite precoce (7 dpi) e degeneração tecidual (20 dpi) nos animais ST2<sup>-/-</sup>.

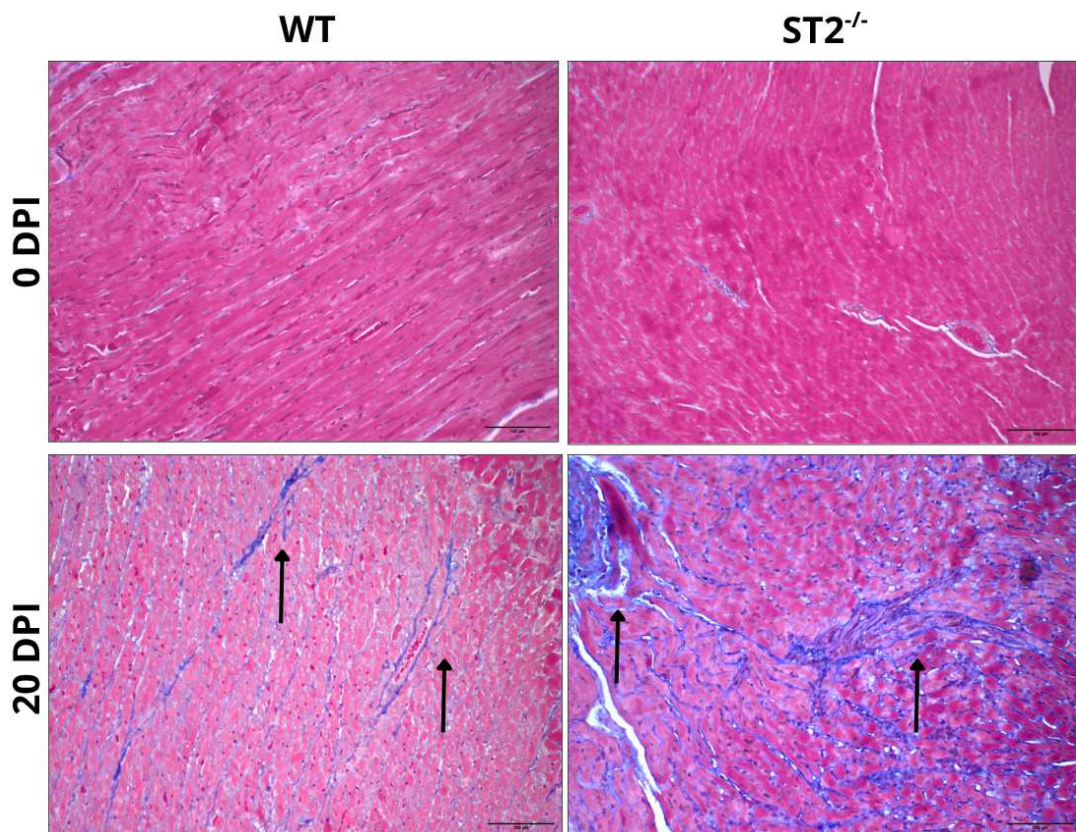


**Figura 23:** Níveis séricos de CK-MB em camundongos BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado (0 dpi), representado pelo asterisco sem a barra, e entre os grupos no mesmo momento da infecção, representado pelo asterisco com a barra. Os dados são expressos como médias ± DP (n 4 - 7 animais). Resultados considerados significantes com \*\*p < 0,01 e \*\*\*\*p < 0,0001. Dados analisados usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

### 5.11 O eixo IL-33/ST2 regula o desenvolvimento de fibrose cardíaca durante a infecção por *T. cruzi* em camundongos BALB/c

A fim de avaliar o desenvolvimento de fibrose no tecido cardíaco, realizou-se a análise histológica de cortes de coração de camundongos WT e ST2<sup>-/-</sup> infectados com a cepa Y de *T.*

*cruzi*. Utilizando a coloração pelo Tricrômico de Masson para detectar a deposição de fibras de colágeno (Figura 24), observamos no tecido cardíaco dos animais WT infectados, a deposição de colágeno de forma organizada, localizada no interstício entre os cardiomiócitos. Em contraste, os animais  $ST2^{-/-}$  infectados apresentaram uma fibrose cardíaca exacerbada e com um padrão desorganizado. Nesses camundongos, as áreas de deposição de colágeno formam feixes mais espessos e uma distribuição difusa pelo miocárdio.

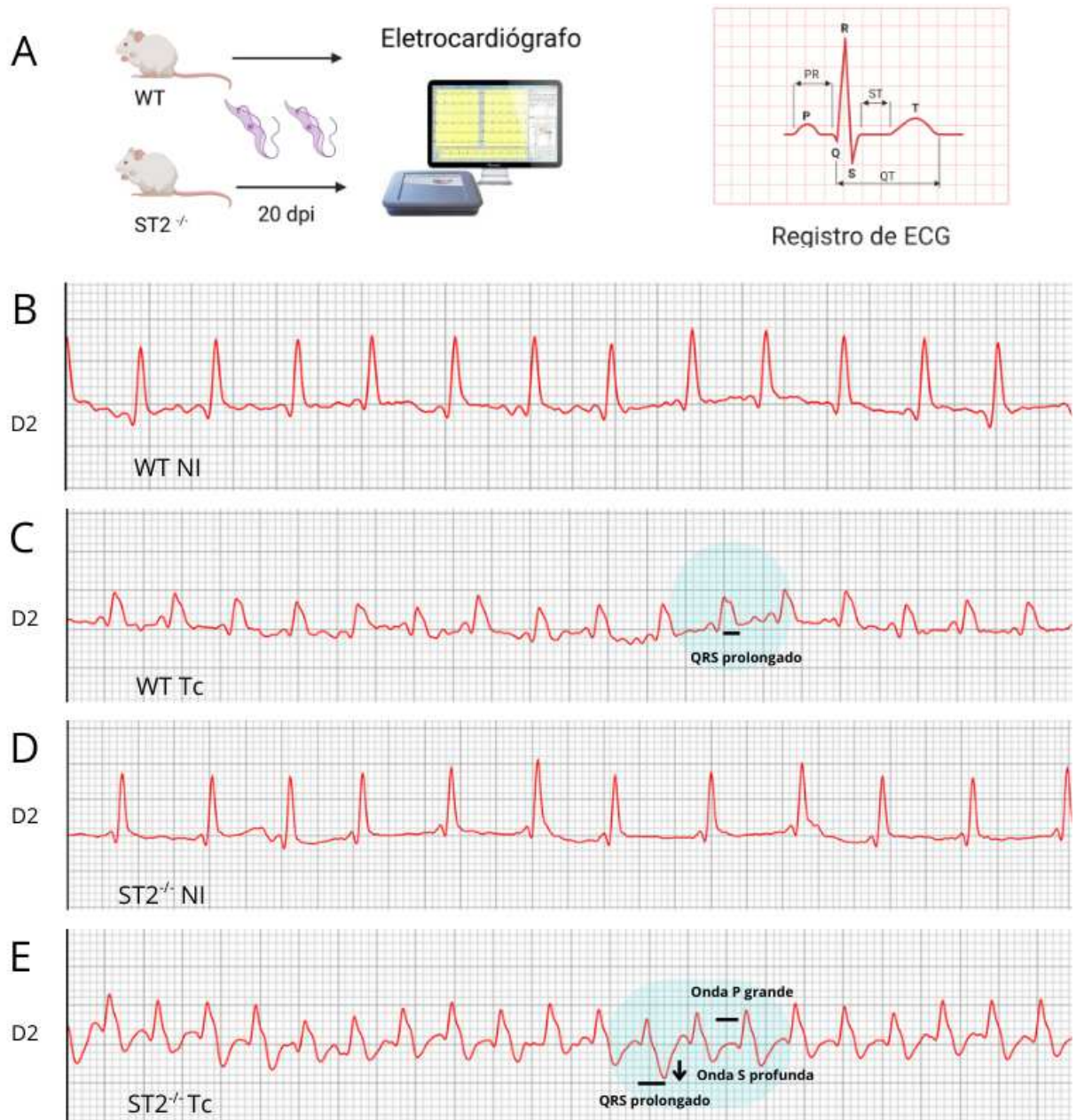


**Figura 24:** Análise histológica do desenvolvimento de fibrose cardíaca em camundongos BALB/c e  $ST2^{-/-}$ , infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Análise da deposição de colágeno pela coloração pelo Tricrômico de Masson. As imagens são representativas de cada grupo experimental. As setas indicam áreas de deposição de colágeno.

### 5.12 Animais sem o receptor ST2 apresentam piora na função cardíaca durante a infecção aguda por *T. cruzi*

Para estimar a intensidade da disfunção cardíaca causada pela infecção por *T. cruzi*, avaliou-se o perfil de atividade elétrica cardíaca durante o pico de dano cardíaco caracterizado na histopatologia (20 dpi) (Figura 25). Observamos registros da atividade cardíaca dentro da normalidade para os animais WT (Figura 25B) ou  $ST2^{-/-}$  (Figura 25D) não infectados. Nos animais WT infectados (Figura 25C), foi possível identificar um prolongamento no complexo

QRS, indicando um comprometimento ventricular. Já para os animais  $ST2^{-/-}$  infectados, além de um prolongamento do complexo QRS, observou-se também o desenvolvimento de aumento da amplitude da onda P e da profundidade da onda S, indicando um comprometimento tanto atrial quanto ventricular (Figura 22E).

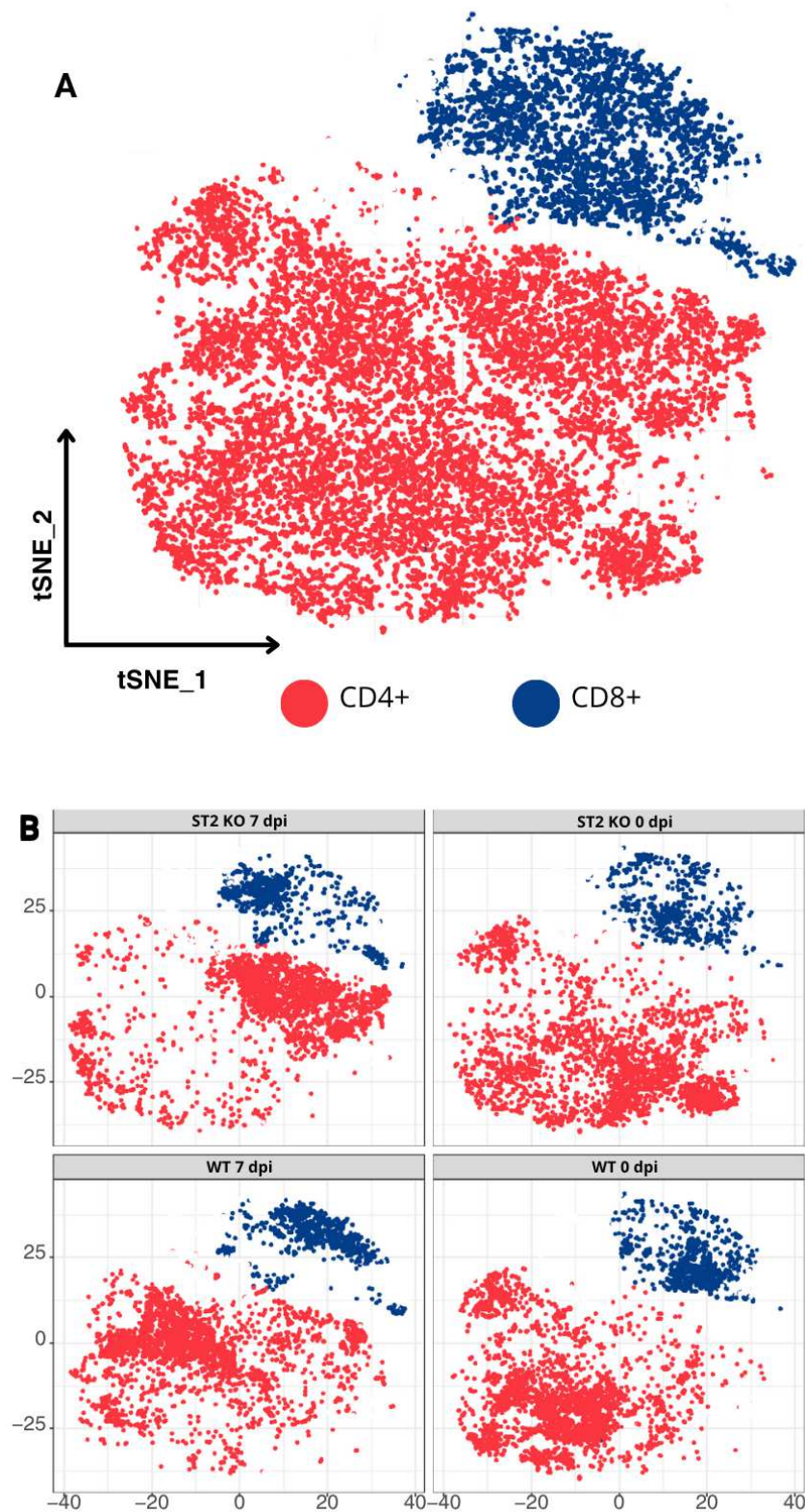


**Figura 25: Avaliação da atividade elétrica de camundongos BALB/c e  $ST2^{-/-}$ , infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Representação esquemática do procedimento de eletrocardiografia (ECG). (B) Registro representativo de ECG na derivação DII de um camundongo WT não infectado (NI). (C) Registro representativo de ECG (DII) de um camundongo WT infectado com *T. cruzi* (Tc), com destaque para o prolongamento do complexo QRS. (D) Registro representativo de ECG (DII) de um camundongo  $ST2^{-/-}$  não infectado (NI). (E) Registro representativo de ECG (DII) de um camundongo  $ST2^{-/-}$  infectado com *T. cruzi* (Tc), com destaque para o prolongamento do complexo QRS, onda P de grande amplitude e onda S profunda.

### **5.13 A deficiência no receptor ST2 modula o perfil inflamatório de linfócitos T durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi***

Após a caracterização da dinâmica geral de leucócitos no sangue periférico e nos tecidos durante a infecção por *T. cruzi*, buscou-se avaliar o perfil imune celular por citometria de fluxo multiparamétrica no baço no 7 dpi. A análise de redução de dimensionalidade por t-SNE dos dados concatenados de todos os grupos experimentais permitiu a visualização dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no baço durante a infecção aguda por *T. cruzi* (Figura 26).

A análise do t-SNE demonstrou a formação de dois grandes clusters celulares distintos, correspondendo predominantemente às populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Na avaliação individualizada por grupo experimental (Figura 26B), observou-se uma distribuição similar dos clusters de linfócitos entre os grupos de camundongos não infectados. Contudo, após a infecção, observamos uma alteração na dispersão desses clusters, particularmente nos camundongos ST2<sup>-/-</sup> infectados, onde as populações de linfócitos pareceram formar agrupamentos polarizados, sugerindo um fenótipo diferenciado.

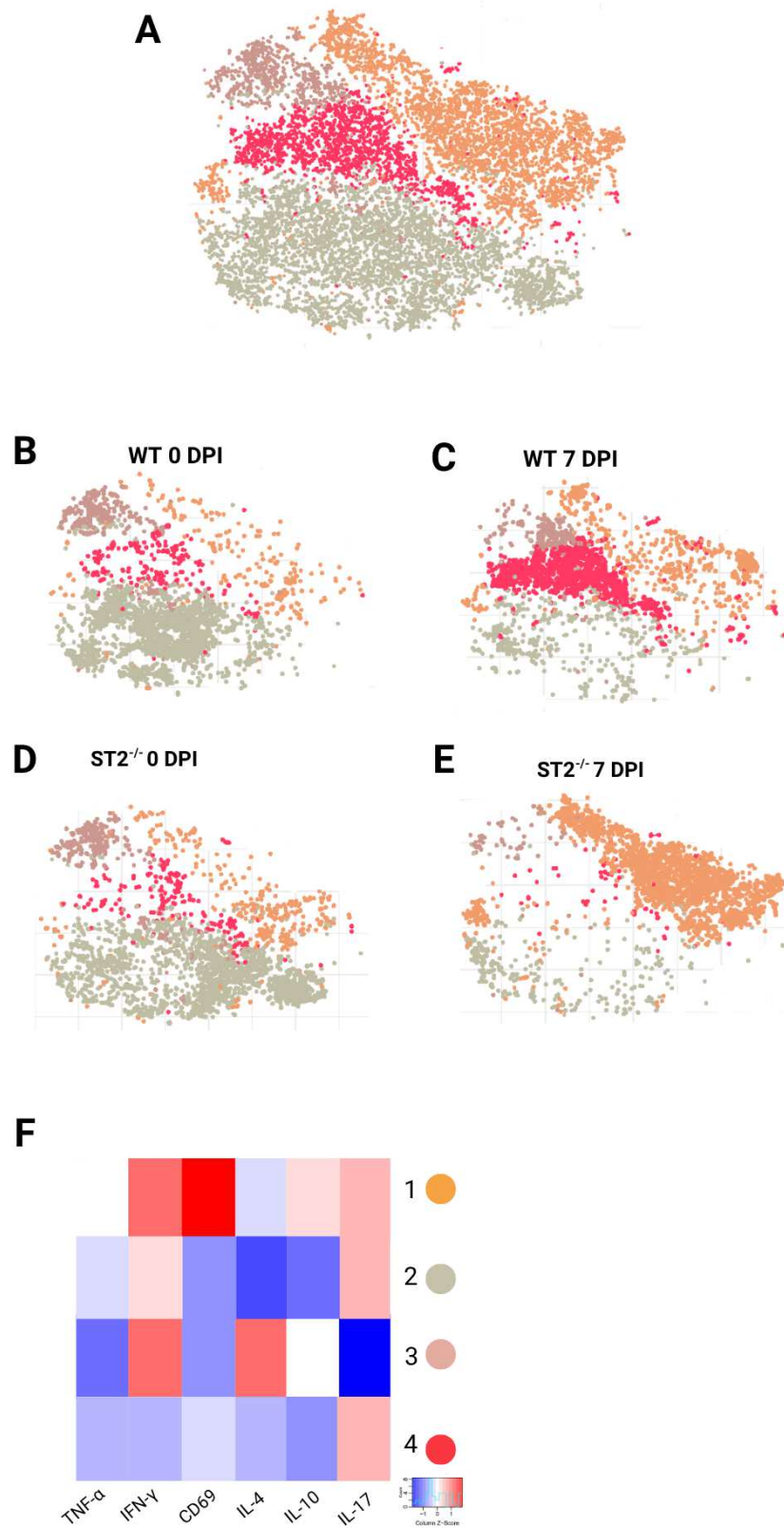


**Figura 26:** Análise dos clusters de linfócitos T no baço por citometria de fluxo de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. (A) t-SNE mostrando os clusters globais de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (vermelho) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (azul). (B) t-SNE das populações celulares separadas por linhagem e tempo de infecção.

A população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> obtida no tecido esplênico foi submetida a uma análise mais refinada para caracterizar distintos perfis destas células de acordo com a expressão dos marcadores CD69, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e IL-17 (Figura 27).

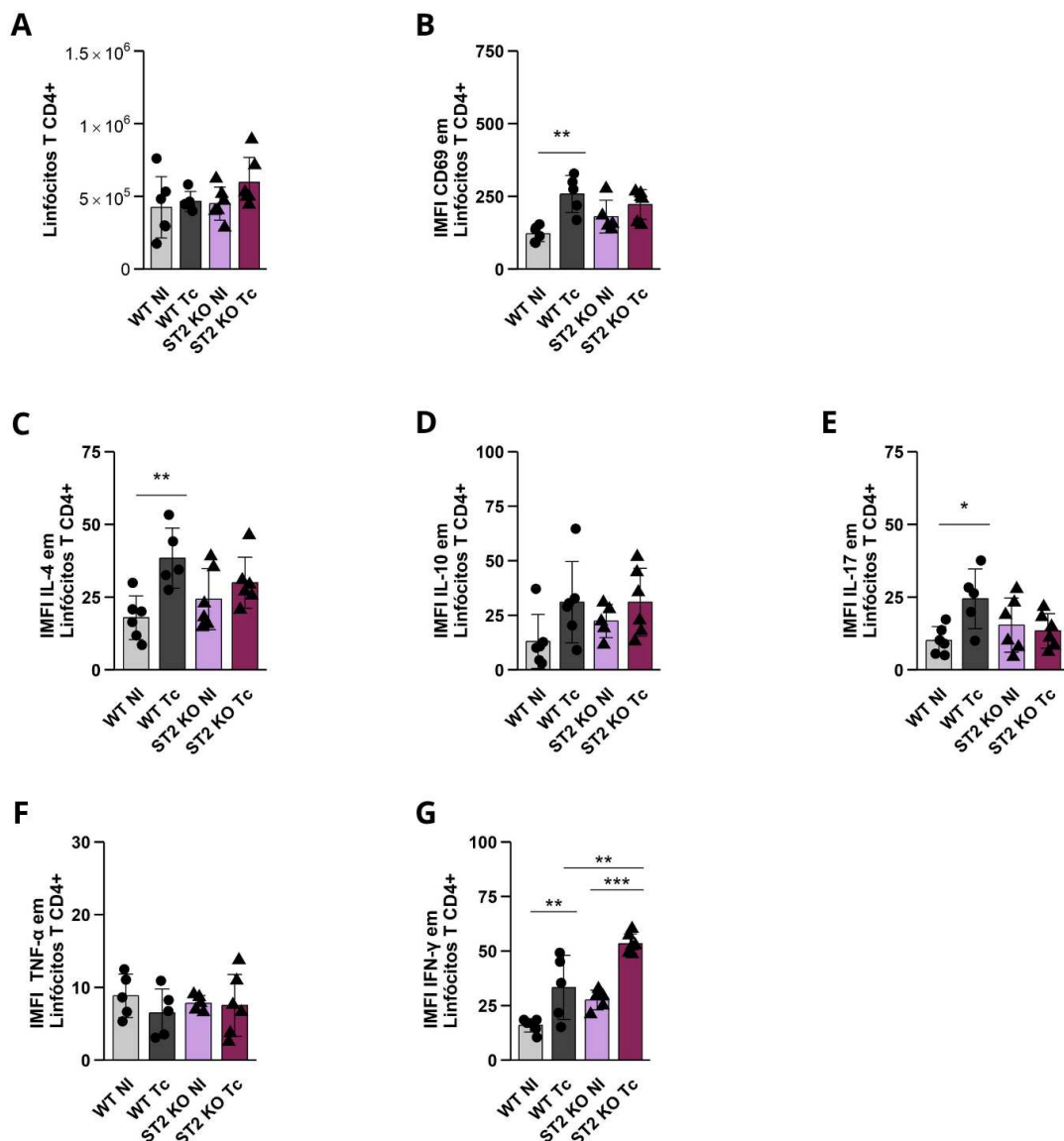
A partir das análises imparciais feitas no t-SNE, foram identificados quatro principais clusters de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos esplenócitos analisados (Figura 27A). Nos camundongos controles, observamos grande similaridade entre os clusters, com predominância do cluster 2, marcado por níveis intermediários de expressão de IL-17 e IFN- $\gamma$  (Figura 27B e Figura 27D). Em relação aos camundongos WT infectados, foi identificada uma predominância do cluster 4, caracterizado por alta expressão de IL-17 e baixa expressão dos demais marcadores (Figura 27C). Já para os camundongos KO infectados, observamos o predomínio do cluster 1, marcado por alta expressão de CD69 e IFN- $\gamma$ , também, é o cluster com maior expressão relativa de TNF- $\alpha$  (Figura 27E).

As populações foram identificadas de acordo com a expressão de marcadores relevantes para caracterização dessas células, representadas na forma de heatmap (Figura 27F).



**Figura 27: Perfil dos clusters de linfócitos T CD4+ no baço por citometria de fluxo de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. (A) t-SNE mostrando os clusters globais de linfócitos T CD4+. (B-E) t-SNE destacando clusters das populações de linfócitos T CD4+ separadas por linhagem e tempo de infecção. (F) Heatmap com a expressão de marcadores por cluster.**

Ao avaliar o perfil dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> no baço, não foram encontradas diferenças no número absoluto desta população entre os grupos analisados (Figura 28A). No entanto, foi verificado nos camundongos WT infectados aumento da expressão de CD69 (Figura 28B), IL-4 (Figura 28C), IL-17 (Figura 28E) e IFN- $\gamma$  (Figura 28G), em relação a seu grupo controle. Já nos camundongos KO infectados, observou-se um aumento da expressão de IFN- $\gamma$ , tanto em comparação com seu controle não infectado, quanto com o grupo selvagem infectado (Figura 28G).

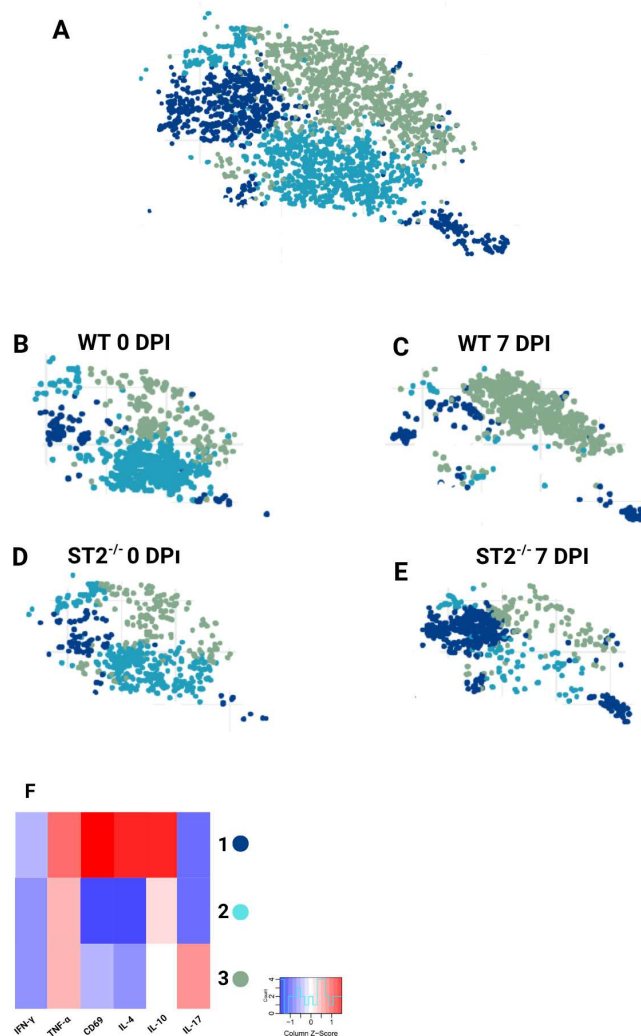


**Figura 28.** Análise das populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> presentes no tecido esplênico de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. (A) Contagem total de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. (B) Intensidade média de fluorescência integrada (IMFI) de CD69 em T CD4<sup>+</sup>. (C) IMFI de IL-4 em linfócitos T CD4<sup>+</sup>. (D) IMFI de IL-10 em linfócitos T CD4<sup>+</sup>. (E) IMFI de IL-17 em linfócitos T CD4<sup>+</sup>. (F) IMFI de TNF- $\alpha$  em linfócitos T CD4<sup>+</sup>. (G) IMFI de IFN- $\gamma$  em linfócitos T CD4<sup>+</sup>. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado, e entre os grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP (n = 5 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \*p < 0,05,

\*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001. Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

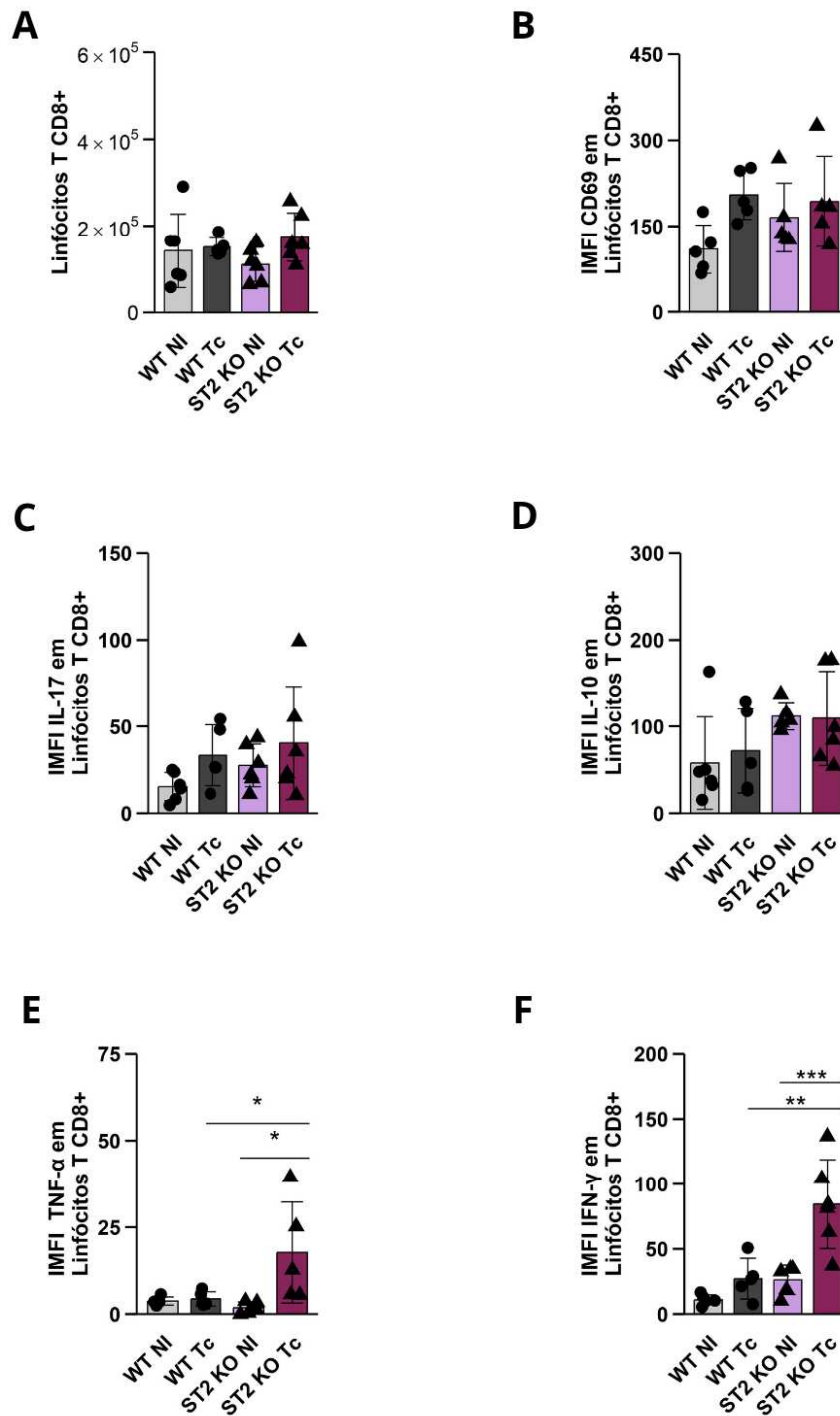
Em seguida, a população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> obtida do tecido esplênico também foi submetida à análise não supervisionada conforme a expressão dos marcadores CD69, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e IL-17 (Figura 29).

A partir das análises de t-SNE, foram identificados três clusters de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em camundongos infectados por *T. cruzi* (Figura 29A). Nos camundongos controles, observamos grande similaridade entre os clusters analisados (Figuras 29B e D). Porém, para os camundongos WT infectados, identificou-se uma predominância do cluster 3, caracterizado por alta expressão de IL-17, expressão intermediária de TNF- $\alpha$  e baixa expressão dos demais marcadores analisados (Figura 29C). Já para os camundongos KO infectados, observamos o predomínio do cluster 1, marcado por alta expressão de CD69, IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$  (Figura 29E). As populações foram identificadas de acordo com a expressão de marcadores representados na forma de heatmap (Figura 29F).



**Figura 29: Análise dos clusters de linfócitos T CD8+ no baço por citometria de fluxo de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) t-SNE mostrando os clusters globais de linfócitos T CD8+. (B-E) t-SNE destacando clusters das populações de linfócitos T CD8+ separadas por linhagem e tempo de infecção. (F) Heatmap com a expressão de marcadores por cluster.

Ao analisar o número total de linfócitos T CD8+ no baço, também não foram encontradas diferenças no número absoluto desta população entre os grupos analisados (Figura 30A). Além disso, não verificamos diferenças na expressão de CD69, IL-10 e IL-17 entre os grupos (Figura 30B-D). No entanto, para os camundongos KO infectados, observamos aumento da expressão de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , tanto em comparação com seu controle não infectado quanto com o grupo selvagem infectado (Figura 30E-F).

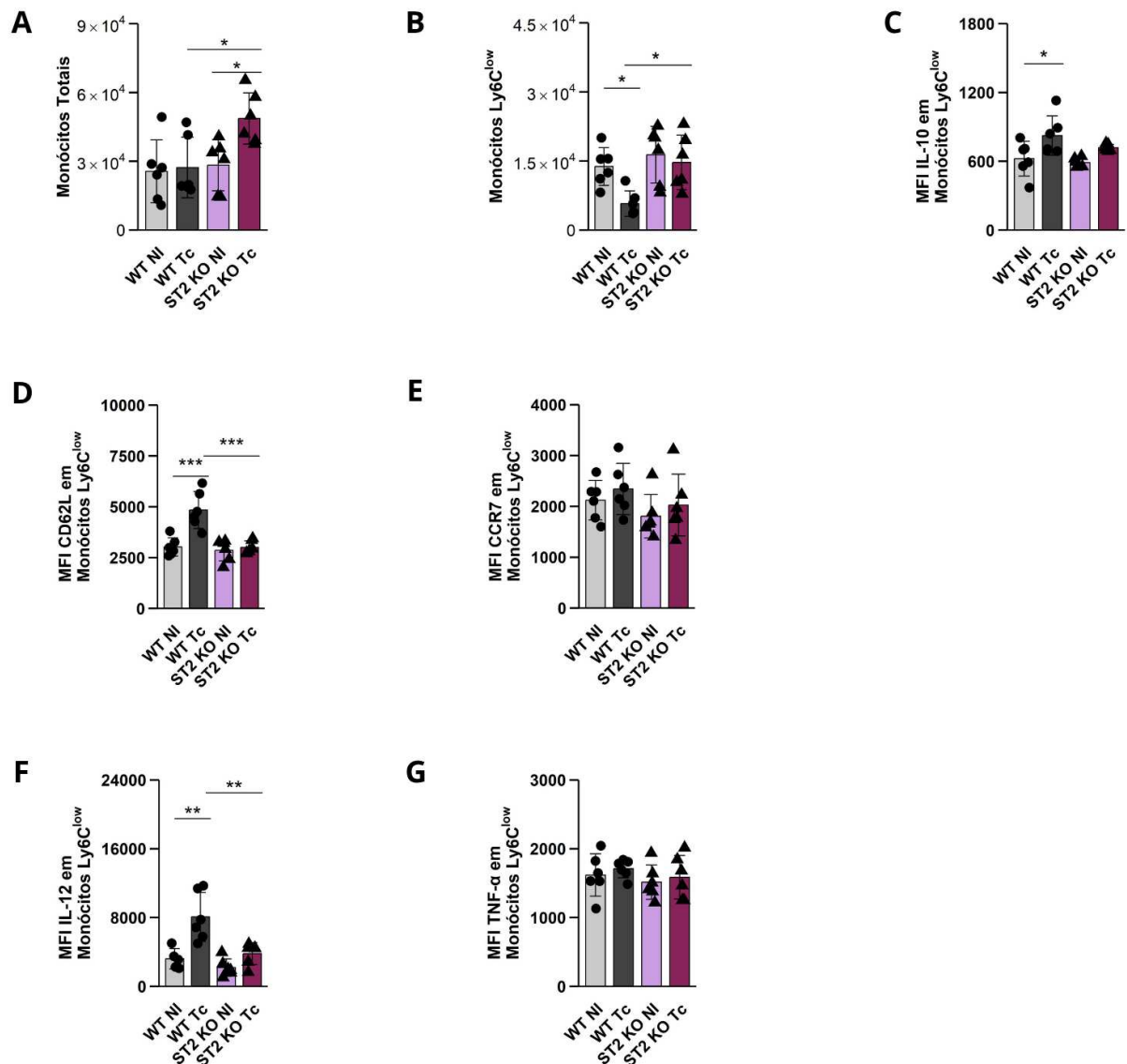


**Figura 30. Perfil das populações de linfócitos T CD8+ presentes no tecido esplênico de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Contagem total de linfócitos T CD8+. (B) Intensidade média de fluorescência integrada (IMFI) de CD69 em T CD8+. (C) IMFI de IL-17 em linfócitos T CD8+. (D) IMFI de IL-10 em linfócitos T CD8+. (E) IMFI de TNF-α em linfócitos T CD8+. (F) IMFI de IFN-γ em linfócitos T CD8+. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado, e entre os grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias ± DP (n 5 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001. Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

#### **5.14 O eixo IL-33/ST2 altera a dinâmica de monócitos durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi***

Foram analisadas as diferentes populações de monócitos no tecido esplênico dos diferentes grupos (Figuras 31 e 32). Por citometria de fluxo, realizamos a imunofenotipagem de monócitos clássicos (Ly6C<sup>high</sup>) e de não clássicos (Ly6C<sup>low</sup>).

Observou-se que apenas nos animais KO, a infecção por *T. cruzi* induz um aumento de monócitos totais no baço, em relação ao seu controle e animais WT infectados (Figura 31A). Com relação aos monócitos Ly6C<sup>low</sup>, foi detectada uma diminuição dessa população nos camundongos WT infectados em comparação com o seu controle não infectado, esses níveis também foram inferiores aos observados nos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados (Figura 31B). Ao avaliar o perfil desses monócitos, constatou-se que, nos camundongos WT infectados, houve um aumento significativo na expressão de IL-10 (Figura 31C), CD62L (Figura 31D) e IL-12 (Figura 31F) em relação aos seus respectivos controles não infectados. Ademais, a expressão de CD62L e IL-12 nos monócitos Ly6C<sup>low</sup> dos animais WT infectados também foi maior em comparação com a dos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados (Figuras 31D e 31F).

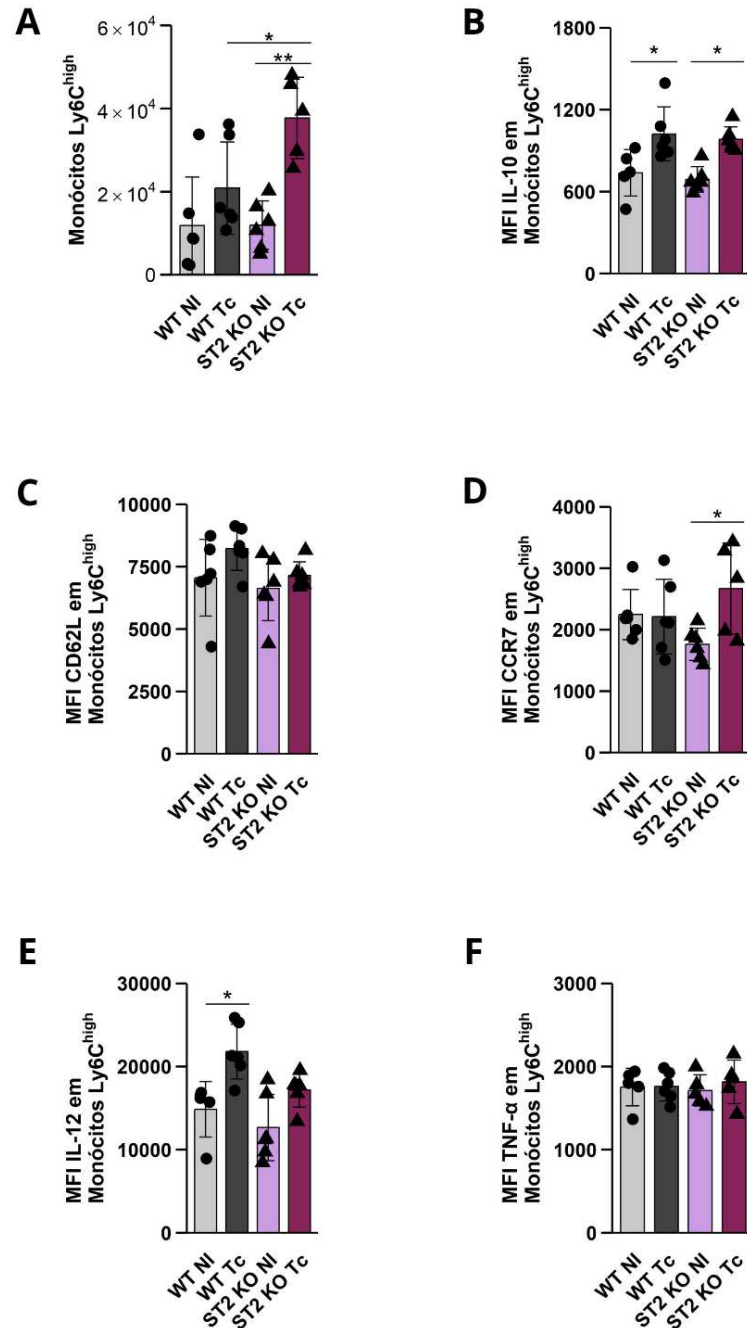


**Figura 31. Populações de monócitos Ly6C<sup>low</sup> presentes no tecido esplênico de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Contagem total de monócitos. (B) Contagem total de monócitos Ly6C<sup>low</sup> (C) MFI de IL-10 em monócitos Ly6C<sup>low</sup>. (D) MFI de CD62L em monócitos Ly6C<sup>low</sup>. (E) MFI de CCR7 em monócitos Ly6C<sup>low</sup>. (F) MFI de IL-12 em monócitos Ly6C<sup>low</sup>. (G) MFI de TNF- $\alpha$  em monócitos Ly6C<sup>low</sup>. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado, e entre os dois grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP (n 5 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

Após identificar diferentes perfis de monócitos Ly6C<sup>low</sup> entre os grupos analisados, foi feita a caracterização dos monócitos Ly6C<sup>high</sup> (Figura 32). Observou-se que a infecção por *T. cruzi* induz também o recrutamento de monócitos Ly6C<sup>high</sup> nos camundongos KO infectados, em relação ao seu controle e animais WT infectados (Figura 32A).

Com relação ao perfil destes monócitos, foi verificado um aumento da expressão de IL-10 para ambos os grupos infectados, em relação a seus respectivos controles (Figura 32B). Além disso, foi identificado um aumento da expressão de CCR7 nos animais KO infectados

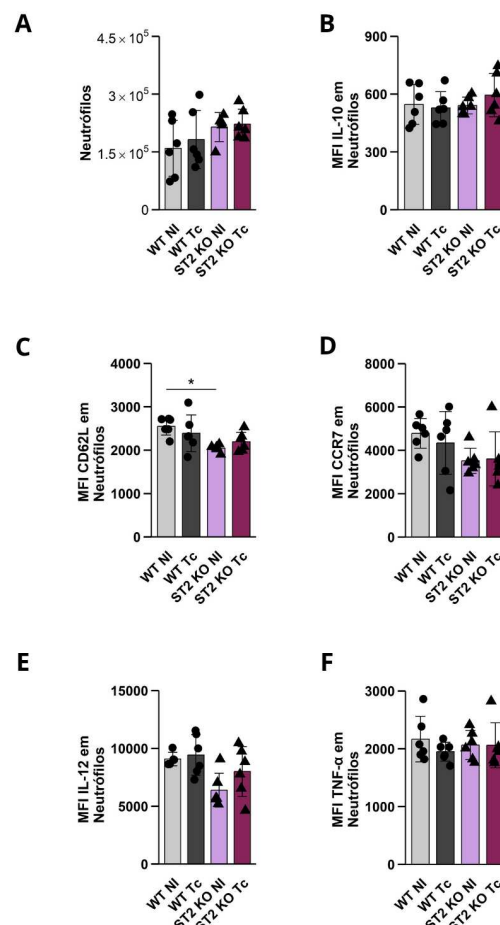
em relação a seus controles (Figura 32D). Ademais, nos camundongos WT infectados, observou-se um aumento na expressão de IL-12 em relação ao seu controle não infectado (Figura 32E).



**Figura 32.** Análise das populações de monócitos Ly6C<sup>high</sup> presentes no tecido esplênico de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi* (A) Contagem total de monócitos Ly6C<sup>high</sup>. (B) MFI de IL-10 em monócitos Ly6C<sup>high</sup>. (C) MFI de CD62L em monócitos Ly6C<sup>high</sup>. (D) MFI de CCR7 em monócitos Ly6C<sup>high</sup>. (E) MFI de IL-12 em monócitos Ly6C<sup>high</sup>. (F) MFI de TNF-α em monócitos Ly6C<sup>high</sup>. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupos de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado, e entre os dois grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias ± DP (n 5 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001. Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

### 5.15 Análise de neutrófilos no tecido esplênico na fase aguda da infecção por *T. cruzi*

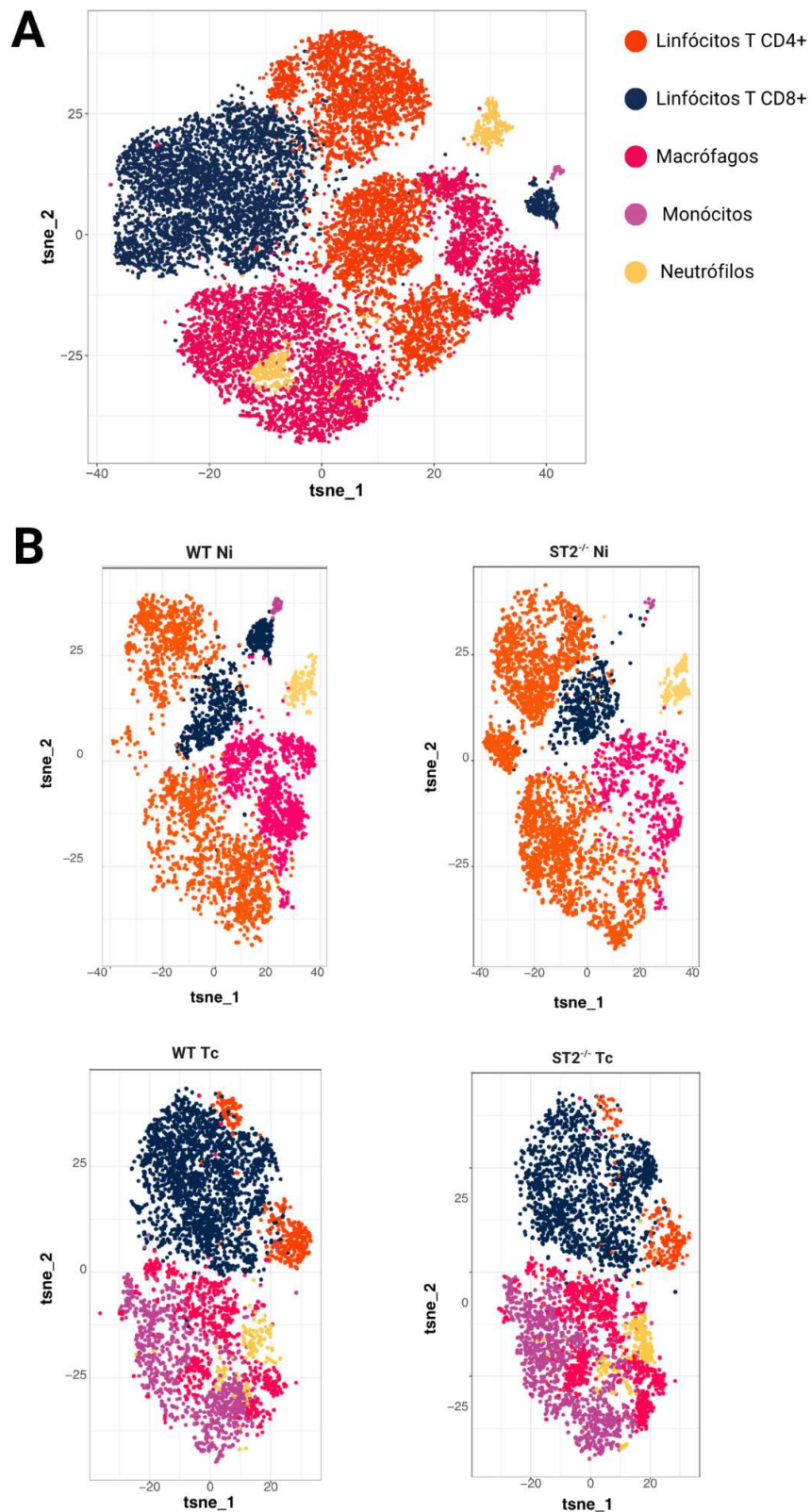
Foi avaliado se o receptor ST2 possui papel no recrutamento de neutrófilos para o baço dos animais durante a infecção por *T. cruzi* por citometria de fluxo (Figura 33). Os resultados demonstram que a infecção não induziu o aumento do número absoluto dessa população para nenhum dos grupos avaliados (Figura 33A). Na avaliação da expressão de CD62L, foi constatado que neutrófilos dos animais ST2<sup>-/-</sup> não infectados possuem menor expressão desta molécula em relação aos animais selvagens não infectados (Figura 33C). Não foram observadas diferenças na expressão dos demais marcadores avaliados após a infecção por *T. cruzi* em nenhum dos grupos (Figura 33B e Figuras 33D-F).



**Figura 33. Perfil das populações de neutrófilos presentes no tecido esplênico de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Contagem total de neutrófilos. (B) MFI de IL-10 em neutrófilos. (C) MFI de CD62L em neutrófilos. (D) MFI de CCR7 em neutrófilos. (E) MFI de IL-12 em neutrófilos. (F) MFI de TNF-α em neutrófilos. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado, e entre os dois grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias ± DP (n 5 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001. Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

### **5.16 A ausência do receptor ST2 altera o perfil de células inflamatórias no coração durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi***

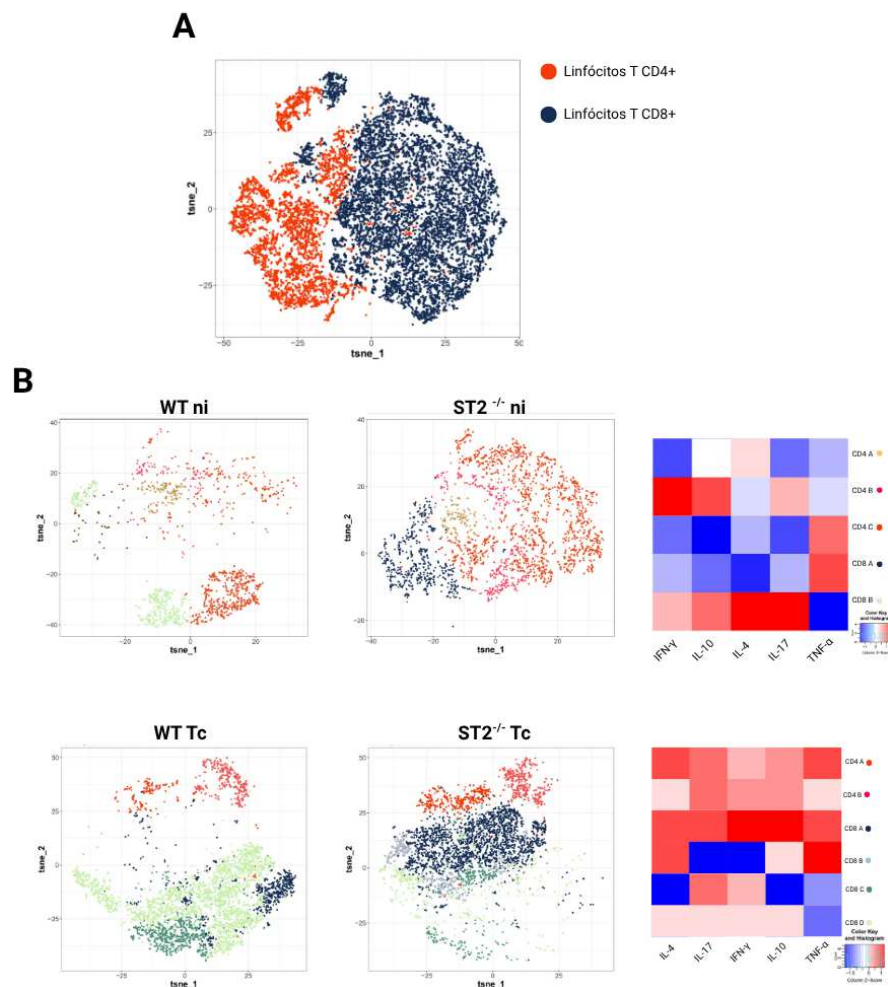
Em seguida, avaliamos o papel do receptor ST2 na dinâmica de recrutamento de células para o coração dos animais durante a infecção aguda (20 dpi, pico de inflamação cardíaca) por *T. cruzi* por meio de citometria de fluxo (Figura 34). Com os resultados do t-SNE, podemos observar a caracterização de linfócitos, macrófagos, neutrófilos e monócitos no tecido cardíaco de animais BALB/c WT ou ST2<sup>-/-</sup>, infectados ou não com *T. cruzi* (Figura 34A). Enquanto animais não infectados apresentam um predomínio de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e macrófagos cardíacos, a infecção induziu um aumento no número de linfócitos CD8<sup>+</sup> e monócitos no tecido. Nos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados, observamos um aumento relativo de populações mieloides (principalmente macrófagos e monócitos), em relação aos animais WT infectados, que apresentam maior proporção de linfócitos (Figura 34B).



**Figura 34: Análises dos clusters do painel celular no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. (A) t-SNE mostrando as populações de linfócitos T CD4+ (laranja), linfócitos T CD8+ (azul), monócitos (roxo), macrófagos (rosa) e neutrófilos (amarelo) de todos os grupos e tempos experimentais concatenados. (B) t-SNE das populações celulares separadas por linhagem e tempo de infecção.**

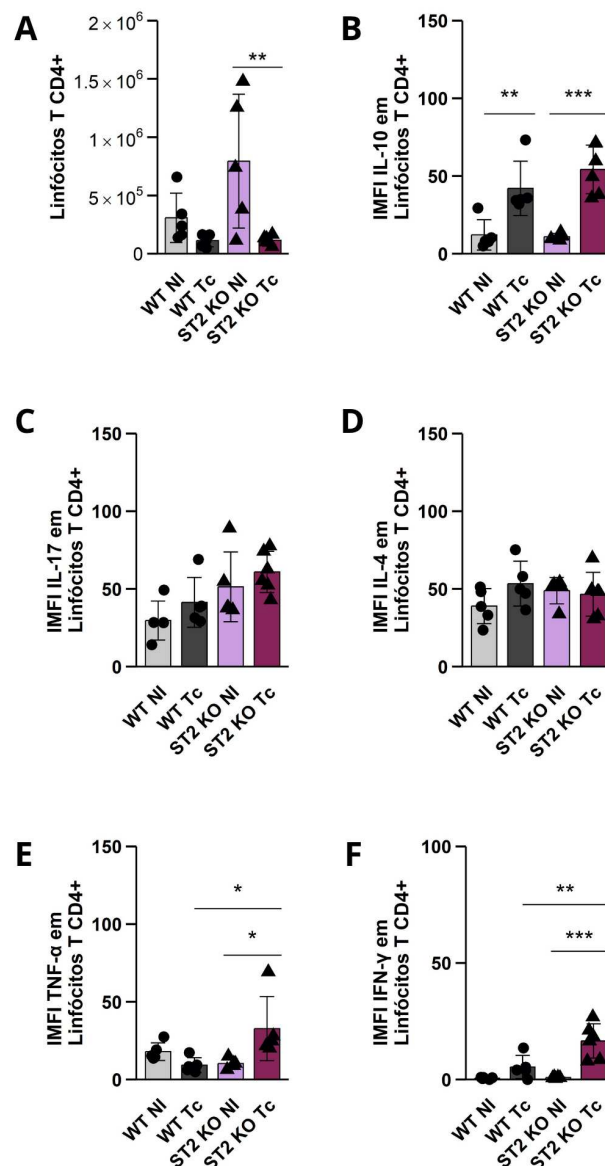
Ao analisar a população linfóide separadamente, observamos inicialmente a distribuição dos linfócitos conforme a expressão de CD4+ ou CD8+ (Figura 35A). Para uma caracterização funcional mais detalhada com base na expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e IL-17, aplicou-se uma nova análise de para identificar subpopulações funcionalmente distintas (Figura 35B). Nos animais não infectados, foram identificados três clusters diferentes de linfócitos CD4+ e dois clusters de linfócitos T CD8+. Já entre os animais infectados, foram identificados dois clusters de linfócitos T CD4+ e quatro clusters de linfócitos T CD8+ (Figura 35B).

A infecção por *T. cruzi* induziu, de modo geral, um perfil de linfócitos T CD4+ com maior expressão relativa de citocinas. Além disso, animais KO infectados apresentaram um cluster de linfócitos T CD8 ativado e multifuncional (cluster CD8 A, Figura 35B) e outro cluster com alta produção de TNF- $\alpha$  (cluster CD8 B, Figura 35B).



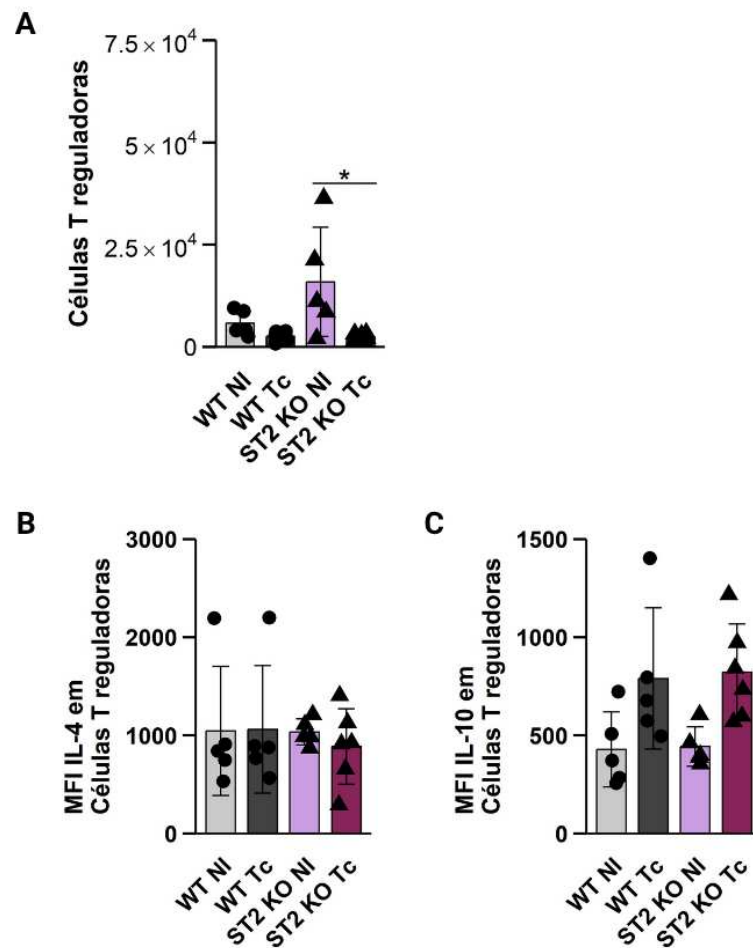
**Figura 35: Análise dos clusters do painel linfóide no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) t-SNE mostrando as populações de linfócitos T CD4+ (laranja), linfócitos T CD8+ (azul) de todos os grupos e tempos experimentais concatenados. (B) t-SNE das populações celulares separadas por linhagem e tempo de infecção, conforme o nível de expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e IL-17.

Na análise quantitativa das populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no coração, observou-se que a infecção induz uma redução no número destas células nos camundongos KO infectados em relação à seus controles (Figura 36A), corroborando as visualizações do t-SNE. Em relação ao perfil funcional, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> de ambos os grupos infectados apresentaram expressão aumentada de IL-10 em comparação com seus respectivos controles não infectados (Figura 36B). Ademais, nos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados, foi observado o aumento significativo da expressão de TNF- $\alpha$  (Figura 36E) e IFN- $\gamma$  (Figura 36F), tanto em relação aos seus respectivos controles não infectados quanto aos animais WT infectados. Não foram observadas diferenças significativas na expressão de IL-17 ou IL-4 (Figura 36C-D).



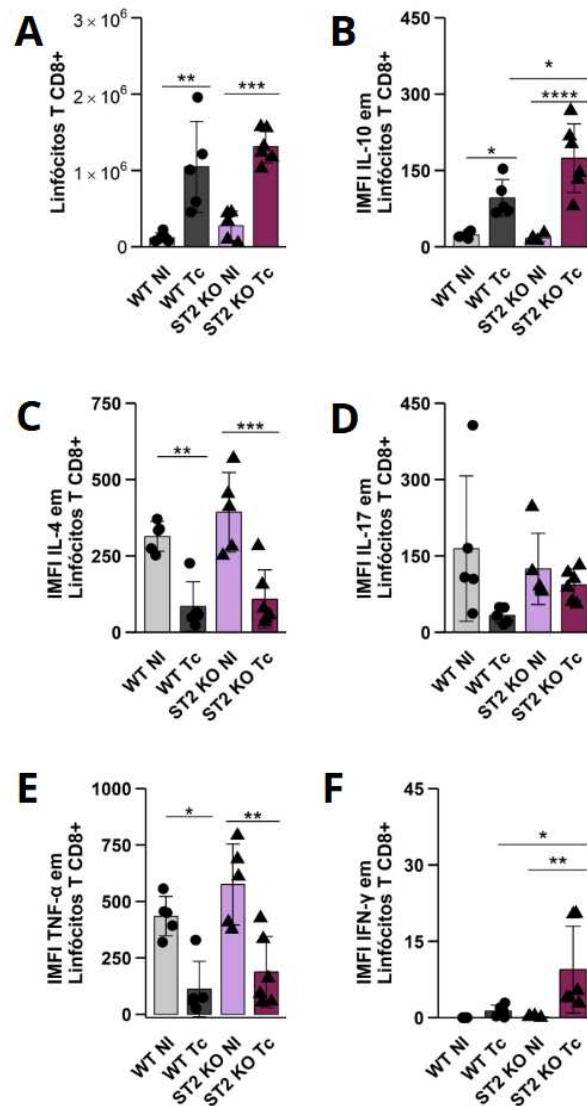
**Figura 36. Populações de linfócitos T CD4+ presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Contagem total de linfócitos T CD4+. (B) IMFI de IL-10 em linfócitos T CD4+. (C) IMFI de IL-17 em linfócitos T CD4+. (D) IMFI de IL-4 em linfócitos T CD4+. (E) IMFI de TNF- $\alpha$  em linfócitos T CD4+. (F) IMFI de IFN- $\gamma$  em linfócitos T CD4+. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado, e entre os dois grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP (n 5 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001. Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

Além das células T CD4+ convencionais, observou-se que, no tecido cardíaco, a infecção por *T. cruzi* induziu uma redução no número de células T regulatórias (Tregs) nos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados quando comparados ao seu respectivo grupo controle não infectado (Figura 37A). Não foram observadas diferenças na expressão de IL-4 ou IL-10 pelas células T regulatórias em nenhum grupos (Figura 37B-C).



**Figura 37. Populações de linfócitos T regulatórios presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Contagem total de linfócitos T regulatórios. (B) MFI de IL-4 em linfócitos T regulatórios. (C) MFI de IL-10 em linfócitos T regulatórios. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado, e entre os grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP (n 5 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001. Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

Como indicado no t-SNE, camundongos infectados apresentaram um aumento no número absoluto de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no tecido cardíaco (Figura 38A). A análise da expressão de IL-10 nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> revelou que a infecção por *T. cruzi* induziu um aumento significativo em ambos os grupos infectados. Essa elevação foi observada tanto nos animais WT em relação a seu controle, quanto nos animais ST2 KO em relação a seu controle. Adicionalmente, a comparação entre os grupos infectados demonstrou que a expressão de IL-10 foi significativamente maior nos animais ST2 KO infectados em relação aos WT infectados (Figura 38B). Em contraste, ambos os grupos infectados demonstraram uma redução na expressão de IL-4 (Figura 38C) e TNF- $\alpha$  (Figura 38E) em comparação com seus respectivos controles não infectados. Ademais, foi observado que os animais ST2<sup>-/-</sup> infectados têm expressão maior de IFN- $\gamma$ , tanto em relação aos seus respectivos controles não infectados quanto aos camundongos WT infectados (Figura 38F). Não foram observadas diferenças na expressão de IL-17 entre nenhum dos grupos analisados (Figura 38D).

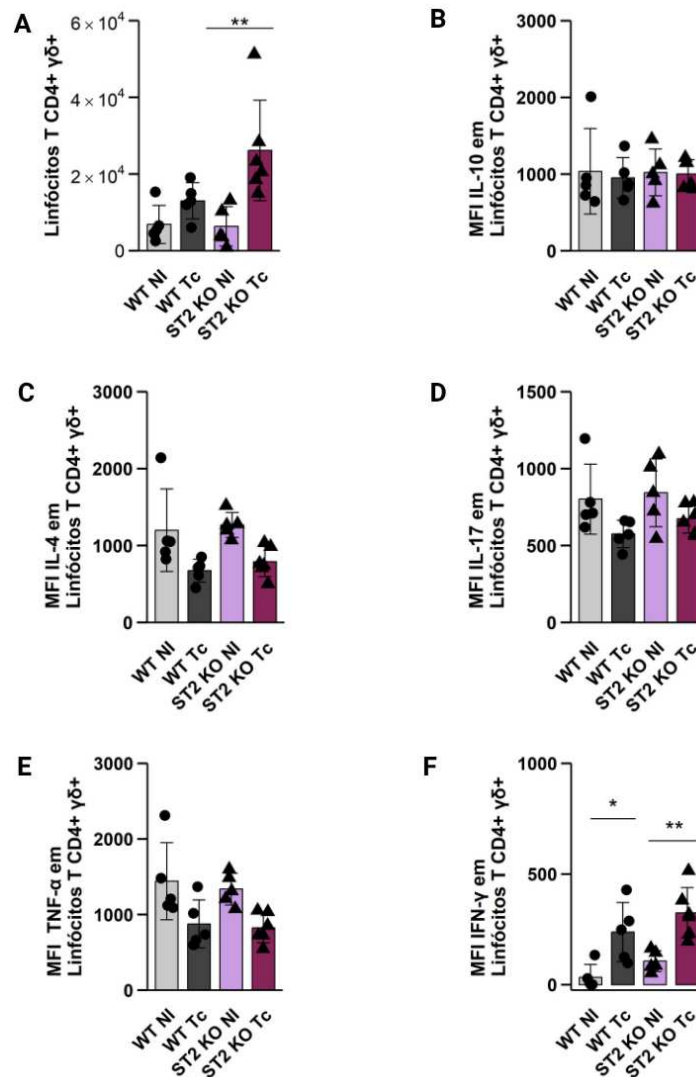


**Figura 38. Populações de linfócitos T CD8+ presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Contagem total de linfócitos T CD8+. (B) IMFI de IL-10 em linfócitos T CD8+. (C) IMFI de IL-4 em linfócitos T CD8+. (D) IMFI de IL-17 em linfócitos T CD8+. (E) IMFI de TNF- $\alpha$  em linfócitos T CD8+. (F) IMFI de IFN- $\gamma$  em linfócitos T CD8+. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado, e entre os grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP (n 5 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001. Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

### 5.17 A infecção aguda por *T. cruzi* altera a dinâmica das populações linfoides T $\gamma\delta$ no coração

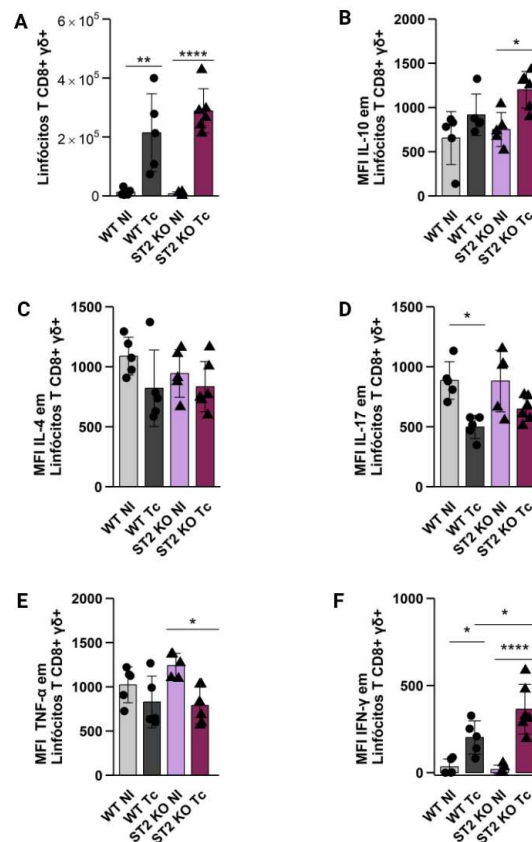
Além dos linfócitos T convencionais T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, mais estudados no contexto da DC, avaliamos também os linfócitos T  $\gamma\delta$ , incluindo os perfis  $\gamma\delta^+$  CD4<sup>+</sup>,  $\gamma\delta^+$  CD8<sup>+</sup> e  $\gamma\delta^+$  duplo-negativos (DN) no tecido cardíaco (Figuras 39-41).

Focando inicialmente nos linfócitos T  $\gamma\delta^+CD4^+$ , observou-se que os animais  $ST2^{-/-}$  infectados apresentaram maior número de linfócitos  $\gamma\delta^+ CD4^+$ , comparados ao seu grupo controle (Figura 39A). Não foram observadas diferenças na expressão de IL-10, IL-4, IL-17 e TNF- $\alpha$  nesta população entre nenhum dos grupos analisados (Figura 39B-E). No entanto, foi observado um aumento na expressão de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T  $\gamma\delta^+CD4^+$  dos animais infectados de ambos os grupos em relação aos seus respectivos controles (Figura 39F).



**Figura 39: Populações de linfócitos  $\gamma\delta^+ CD4^+$  presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e  $ST2^{-/-}$ , infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Contagem total de linfócitos T  $\gamma\delta^+ CD4^+$ . (B) MFI de IL-10 em linfócitos T  $\gamma\delta^+ CD4^+$ . (C) MFI de IL-4 em linfócitos T  $\gamma\delta^+ CD4^+$ . (D) MFI de IL-17 em linfócitos T  $\gamma\delta^+ CD4^+$ . (E) MFI de TNF- $\alpha$  em linfócitos T  $\gamma\delta^+ CD4^+$ . (F) MFI de IFN- $\gamma$  em linfócitos T  $\gamma\delta^+ CD4^+$ . As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou  $ST2^{-/-}$ ) com seu grupo não infectado, e entre os grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP (n 5 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

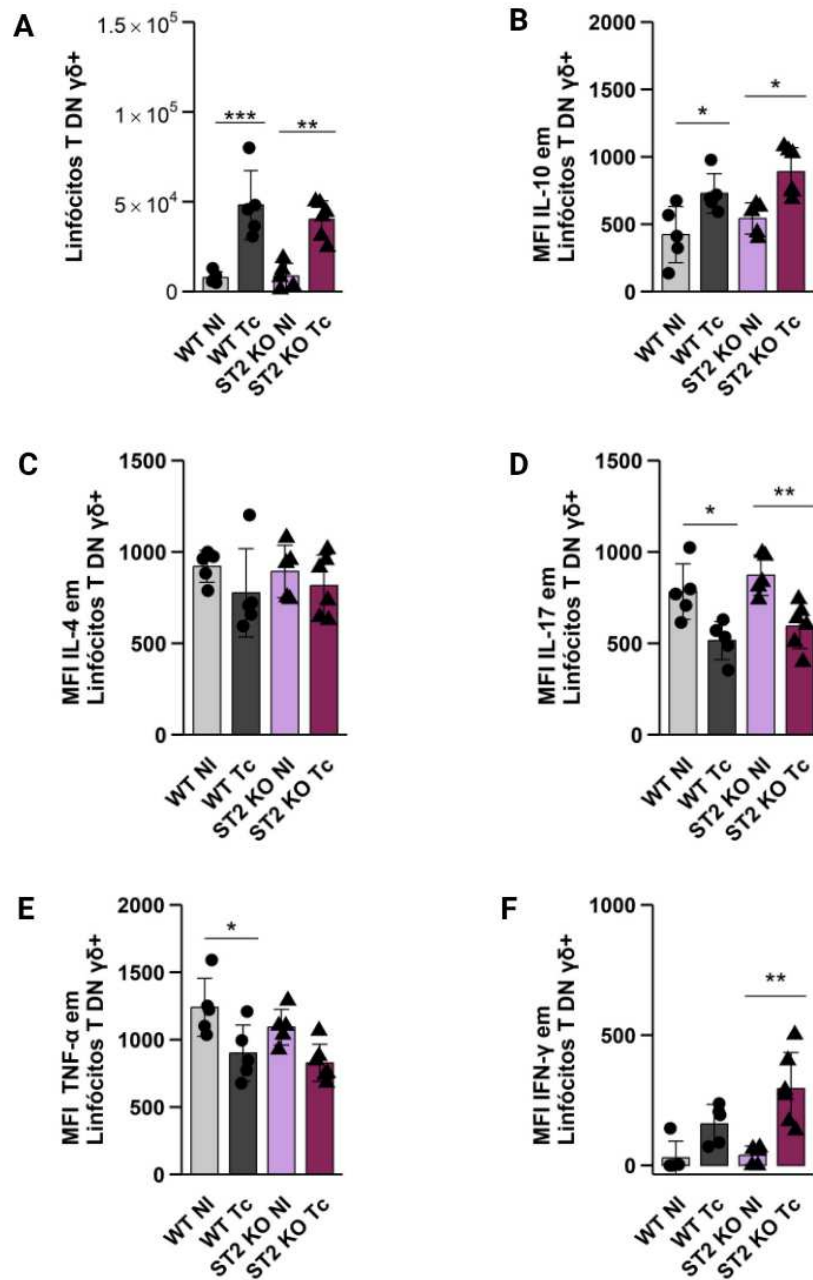
Em seguida, avaliamos o papel do receptor ST2 na dinâmica de linfócitos T  $\gamma\delta^+$  CD8<sup>+</sup> no coração dos animais durante a infecção por *T. cruzi* por citometria de fluxo (Figura 40). Os resultados mostram que a infecção induziu o aumento de linfócitos T  $\gamma\delta^+$  CD8<sup>+</sup> no tecido cardíaco em ambas os grupos (Figura 40A). Na análise do perfil de citocinas expressas por estas células, observou-se que, nos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados, houve um aumento da expressão de IL-10 (Figura 40B) e uma redução da expressão de TNF- $\alpha$  (Figura 40E) em comparação com seus respectivos controles não infectados. Já para os animais WT infectados, detectou-se uma redução na expressão de IL-17 (Figura 40D) em relação ao seu respectivo controle não infectado (WT NI). Não foram observadas alterações na expressão de IL-4 (Figura 40C) por linfócitos T  $\gamma\delta^+$ CD8<sup>+</sup> entre os grupos analisados. Ademais, foi observado um aumento significativo da expressão de IFN- $\gamma$  nos linfócitos T  $\gamma\delta^+$ CD8<sup>+</sup> dos camundongos infectados de ambos os grupos em relação aos seus respectivos controles não infectados, sendo este aumento ainda mais pronunciado nos camundongos ST2<sup>-/-</sup> infectados em relação aos camundongos WT (Figura 40F).



**Figura 40.** Populações de linfócitos  $\gamma\delta^+$  CD8<sup>+</sup> presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. (A) Contagem total de linfócitos T  $\gamma\delta^+$  CD8<sup>+</sup>. (B) MFI de IL-10 em linfócitos T  $\gamma\delta^+$  CD8<sup>+</sup>. (C) MFI de IL-4 em linfócitos T  $\gamma\delta^+$  CD8<sup>+</sup>. (D) MFI de IL-17 em linfócitos T  $\gamma\delta^+$  CD8<sup>+</sup>. (E) MFI de TNF- $\alpha$  em linfócitos T  $\gamma\delta^+$  CD8<sup>+</sup>. (F) MFI de IFN- $\gamma$  em linfócitos T  $\gamma\delta^+$  CD8<sup>+</sup>. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado, e entre os

grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP (n 5 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

Analisou-se também o perfil dos linfócitos T  $\gamma\delta^+$  DN no tecido cardíaco (Figura 41). Foi demonstrado um aumento no número de linfócitos T  $\gamma\delta^+$  DN no coração dos animais infectados em comparação com seus respectivos controles (Figura 41A). Este aumento foi acompanhado por alterações no perfil de citocinas: observou-se um aumento da expressão de IL-10 (Figura 41B) e uma redução na expressão de IL-17 (Figura 41D) pelos linfócitos T  $\gamma\delta^+$ DN de ambos os grupos infectadas quando comparadas aos seus respectivos controles não infectados. Não foram observadas diferenças na expressão de IL-4 por esta população celular entre os grupos analisados (Figura 41C). Em relação ao TNF- $\alpha$ , detectou-se uma redução da sua expressão em camundongos WT infectados em comparação com seu controle não infectado (Figura 41E). Ademais, observou-se um aumento significativo na expressão de IFN- $\gamma$  apenas para os camundongos ST2<sup>-/-</sup> infectados em comparação com seu controle não infectado (Figura 41F).



**Figura 41. Populações de linfócitos  $\gamma\delta^+$  DN presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e  $ST2^{-/-}$ , infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Contagem total de linfócitos T  $\gamma\delta^+$  DN. (B) MFI de IL-10 em linfócitos T  $\gamma\delta^+$  DN. (C) MFI de IL-4 em linfócitos T  $\gamma\delta^+$  DN. (D) MFI de IL-17 em linfócitos T  $\gamma\delta^+$  DN. (E) MFI de TNF- $\alpha$  em linfócitos T  $\gamma\delta^+$  DN. (F) MFI de IFN- $\gamma$  em linfócitos T  $\gamma\delta^+$  DN. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou  $ST2^{-/-}$ ) com seu grupo não infectado, e entre os grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP (n 5 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

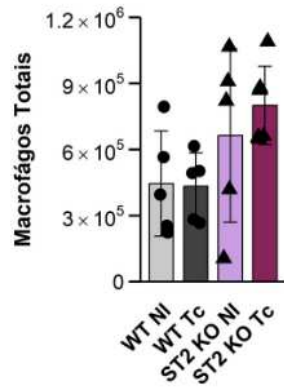
### 5.18 A deficiência no receptor ST2 altera o perfil de macrófagos cardíacos durante a infecção aguda por *T. cruzi*

Considerando o papel dos macrófagos na manutenção da homeostase e função cardíaca, realizou-se a imunofenotipagem de subpopulações de macrófagos residentes e recrutados do coração de camundongos WT e ST2<sup>-/-</sup> infectados ou não com *T. cruzi*, através de citometria de fluxo multiparamétrica.

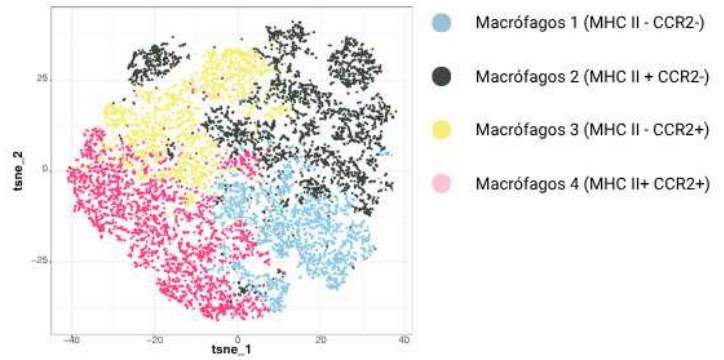
Inicialmente, não observamos alterações no total de macrófagos no coração entre os grupos observados (Figura 42A). A análise de agrupamento por t-SNE foi aplicada para auxiliar na identificação de subpopulações de macrófagos durante a infecção. Desta forma, nos camundongos não infectados, foram identificadas quatro populações de macrófagos cardíacos conforme a expressão de CCR2 e MHC II (Figura 42B-D e heatmap 42E). Além disso, estas populações foram refinadas conforme a expressão dos marcadores CX3CR1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e IL-17. A população de macrófagos MHC II<sup>+</sup> CCR2<sup>+</sup> exibe o perfil mais ativo na produção da maioria das citocinas avaliadas, enquanto as demais populações apresentaram expressão baixa ou intermediária desses mediadores. (Figura 42C-F).

Enquanto os camundongos não infectados apresentavam uma distribuição característica das quatro populações, nos camundongos infectados observou-se uma alteração nesse perfil, com um predomínio relativo de macrófagos MHC II<sup>+</sup> CCR2<sup>+</sup>, além de uma redução drástica da população residente (MHC II<sup>-</sup> CCR2<sup>-</sup>). Ademais, dentre os camundongos infectados, a análise via t-SNE possibilitou identificar duas populações principais de macrófagos MHCII<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>: uma população caracterizada por baixa expressão relativa de citocinas e alta expressão de CX3CR1, predominante nos camundongos WT infectados (Figura 42G e heatmap 42J); e outra população, proeminente nos camundongos ST2<sup>-/-</sup>, caracterizada por expressão intermediária de CX3CR1 e alta expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Figura 42H e heatmap 42J).

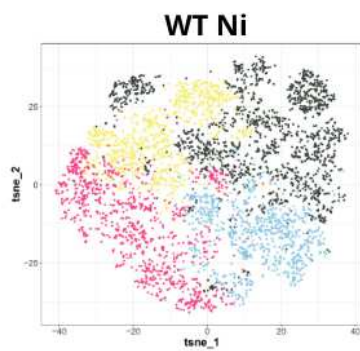
**A**



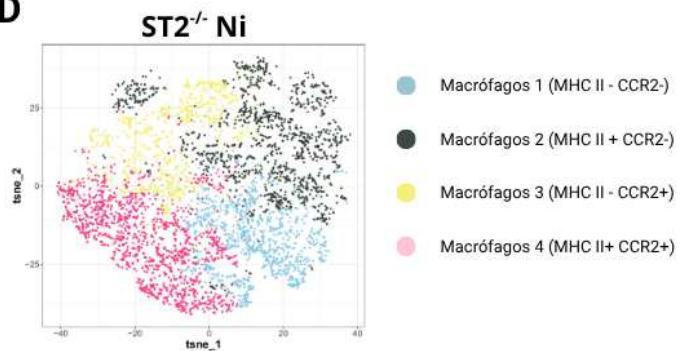
**B**



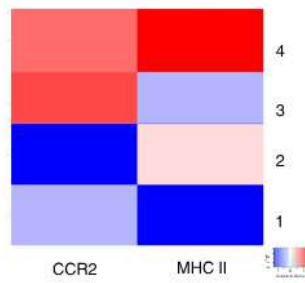
**C**



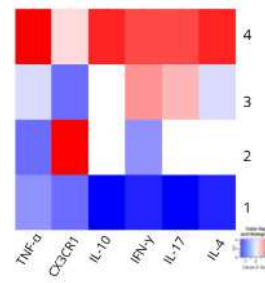
**D**



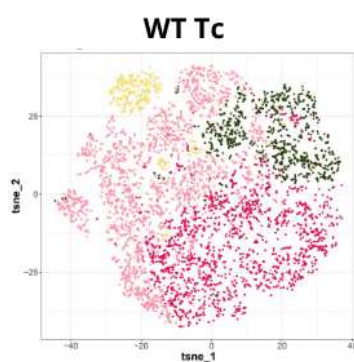
**E**



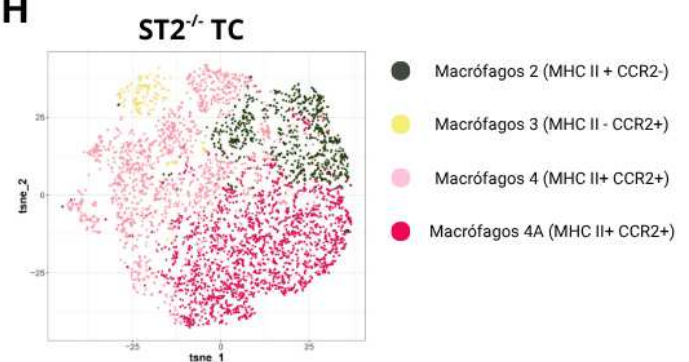
**F**



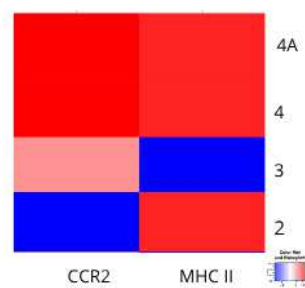
**G**



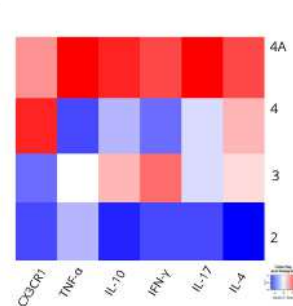
**H**



**I**

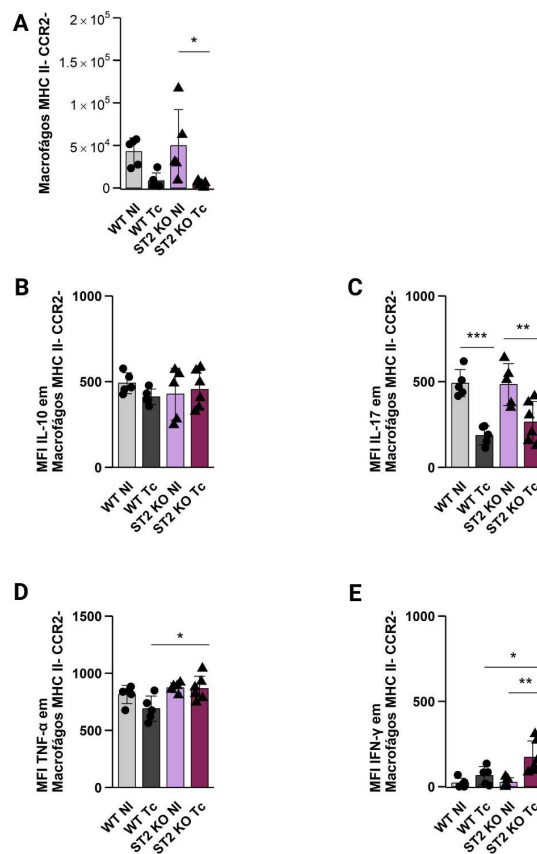


**J**



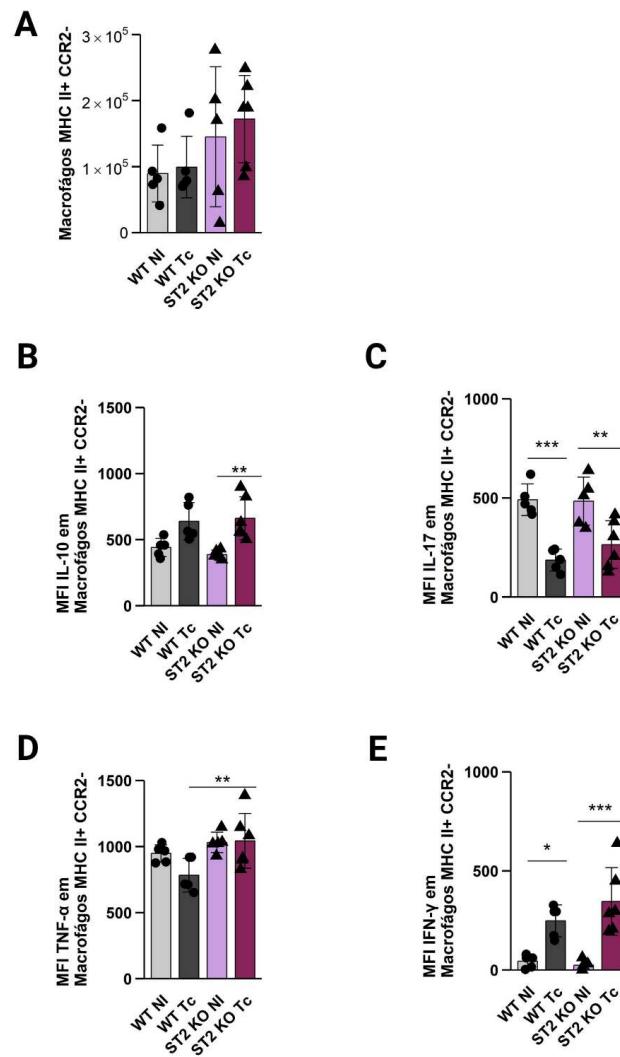
**Figura 42: Análise de clusters de macrófagos cardíacos identificados por citometria de fluxo de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Número total de macrófagos observados no tecido cardíaco. (B) t-SNE mostrando as populações de macrófagos cardíacos de todos os grupos e tempos experimentais concatenados. (C) t-SNE mostrando as populações de macrófagos cardíacos dos camundongos WT não infectados. (D) t-SNE mostrando as populações de macrófagos cardíacos dos camundongos ST2<sup>-/-</sup> não infectados. (E) Heatmap da expressão dos marcadores CCR2 e MHC-II, com os quais foram identificados os clusters de macrófagos cardíacos. (F) Heatmap da expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e IL-17 com os quais foram caracterizados fenotipicamente os clusters de macrófagos cardíacos. (G) t-SNE mostrando as populações de macrófagos cardíacos dos camundongos WT infectados. (H) t-SNE mostrando as populações de macrófagos cardíacos dos camundongos ST2<sup>-/-</sup> infectados. (I) Heatmap da expressão dos marcadores CCR2 e MHC-II, com os quais foram identificados os clusters de macrófagos cardíacos. (J) Heatmap da expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e IL-17 com os quais foram caracterizados fenotipicamente os clusters de macrófagos cardíacos. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado, e entre os dois grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP (n 5 - 6 animais). Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

Similar ao observado no t-SNE, observamos uma redução nos macrófagos residentes MHC II - CCR2- para os camundongos KO infectados em relação ao seu controle (Figura 43A). Para ambos os grupos infectados, foi verificada uma redução na expressão de IL-17 em comparação a seus controles (Figura 43C). Além disso, nos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados, foi observada uma expressão maior de TNF- $\alpha$  (Figura 43D) em relação aos seus controles não infectados, e um aumento da expressão de IFN- $\gamma$  (Figura 43E), tanto em comparação com seu controle não infectado quanto com os animais selvagens infectados. Não foram observadas alterações significativas na expressão de IL-10 (Figura 43B) pelos macrófagos MHCII-CCR2- entre os grupos analisados.



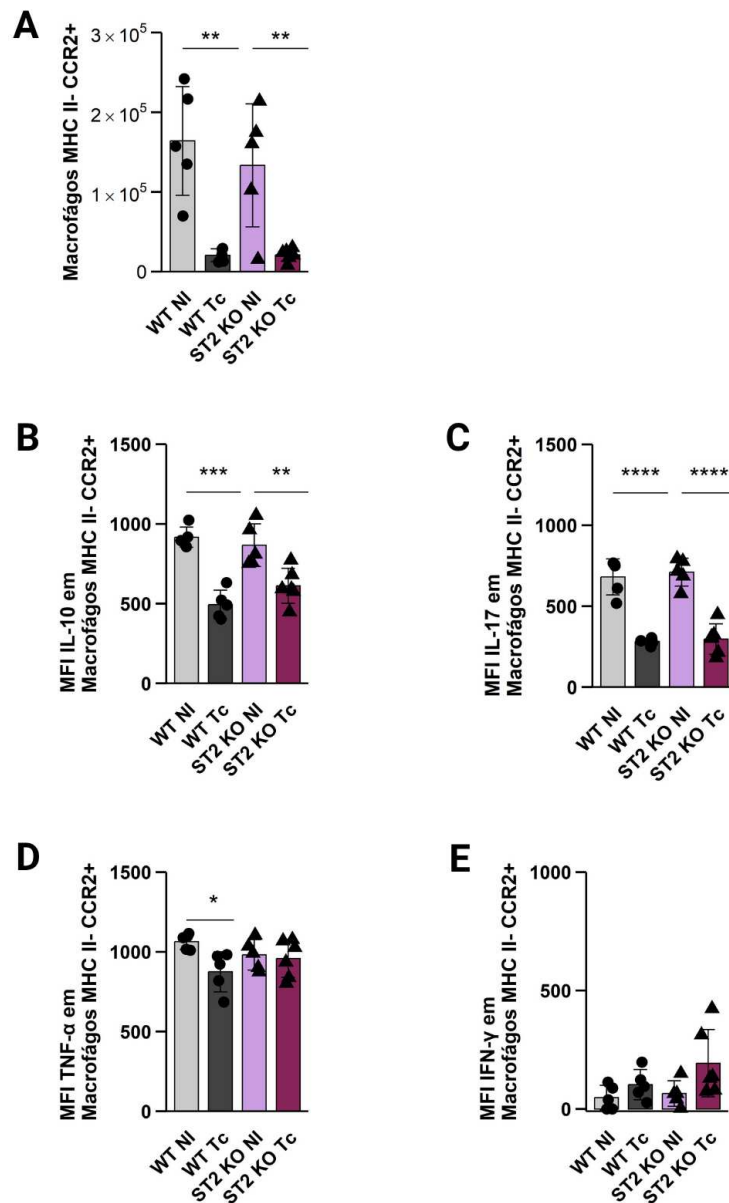
**Figura 43. Populações de macrófagos cardíacos MHC II- CCR2- presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Contagem total de macrófagos MHC II- CCR2-. (B) MFI de IL-10 em macrófagos MHC II- CCR2-. (C) MFI de IL-17 em macrófagos MHC II- CCR2-. (D) MFI de TNF- $\alpha$  em macrófagos MHC II- CCR2-. (E) MFI de IFN- $\gamma$  em macrófagos MHC II- CCR2-. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado, e entre os grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP (n 5 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

Ao analisar o perfil dos macrófagos MHC II<sup>+</sup> CCR2<sup>-</sup>, não foram observadas diferenças no número de macrófagos com este fenótipo entre os grupos avaliados (Figura 44A). No entanto, para ambos os grupos infectados, houve uma redução na expressão de IL-17 (Figura 44C) e um aumento na expressão de IFN- $\gamma$  (Figura 44E), em relação aos seus respectivos controles não infectados. Além disso, nos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados, observamos um aumento na expressão de IL-10 (Figura 44B) em relação ao seu controle não infectado, e um aumento significativo na expressão de TNF- $\alpha$  (Figura 44D) em comparação com os animais WT infectados.



**Figura 44. Populações de macrófagos cardíacos MHC II+ CCR2- presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Contagem total de macrófagos MHC II+ CCR2-. (B) MFI de IL-10 em macrófagos MHC II+ CCR2-. (C) MFI de IL-17 em macrófagos MHC II+ CCR2-. (D) MFI de TNF- $\alpha$  em macrófagos MHC II+ CCR2-. (E) MFI de IFN- $\gamma$  em macrófagos MHC II+ CCR2-. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado, e entre os grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP (n 5 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

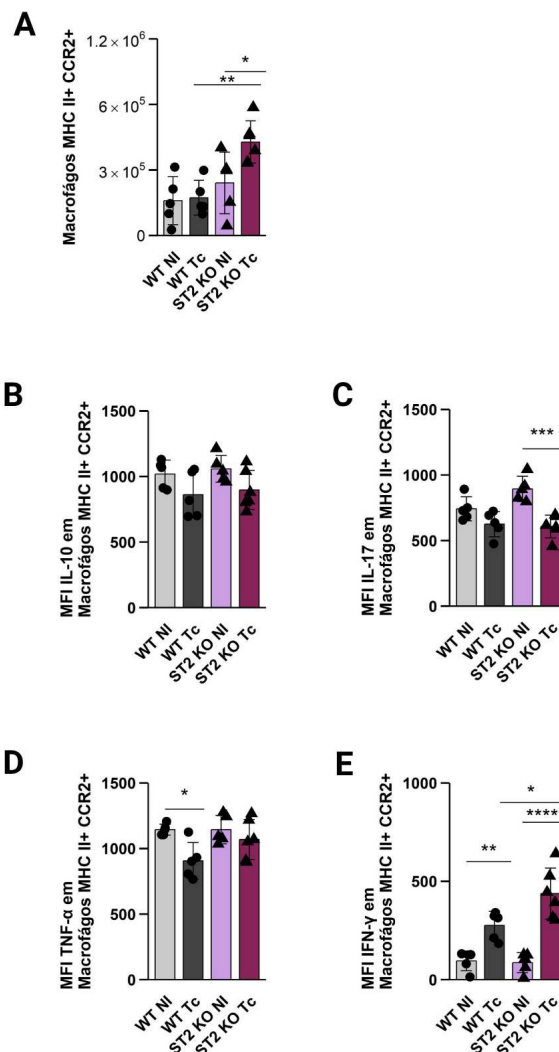
Ao verificarmos o perfil de macrófagos recrutados, observamos que a infecção por *T. cruzi* induziu uma redução no número de macrófagos MHC II- CCR2<sup>+</sup> no tecido cardíaco (Figura 45A). Além disso, para ambos os grupos infectados, ocorreu uma redução na expressão de IL-10 (Figura 45B) e IL-17 (Figura 45C) por estas células em comparação com seus respectivos controles não infectados. Ademais, para os animais WT infectados, também houve uma redução na expressão de TNF- $\alpha$  em comparação com seus controles não infectados (Figura 45D). Não foram detectadas alterações na expressão de IFN- $\gamma$  (Figura 45E) por macrófagos MHCII-CCR2<sup>+</sup> entre os grupos analisados,



**Figura 45. Populações de macrófagos cardíacos MHC II- CCR2+ presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Contagem total de macrófagos MHC II- CCR2+. (B) MFI de IL-10 em macrófagos MHC II- CCR2+. (C) MFI de IL-17 em macrófagos MHC II- CCR2+. (D) MFI de TNF- $\alpha$  em macrófagos MHC II- CCR2+. (E) MFI de IFN- $\gamma$  em macrófagos MHC II- CCR2+. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado, e entre os grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP (n 5 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

Também analisamos o perfil dos macrófagos MHC II+ CCR2+ no tecido cardíaco (Figura 46). Foi demonstrado que camundongos ST2<sup>-/-</sup> infectados apresentaram um número maior desta população celular em comparação com o seu respectivo controle não infectado e também com os animais selvagens infectados (Figura 46A). Quanto ao perfil de citocinas, os macrófagos MHCII+CCR2+ dos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados exibiram um aumento na expressão

de IFN- $\gamma$  (Figura 46E) em comparação com ambos os grupos mencionados. Além disso, foi observado que, enquanto os animais ST2<sup>-/-</sup> infectados apresentaram uma redução significativa na expressão de IL-17 (Figura 46C) em comparação com seus respectivos controles não infectados, os camundongos WT infectados apresentaram menor expressão de TNF- $\alpha$  quando em comparação com seus respectivos controles não infectados (Figura 46D). Não foram detectadas alterações na expressão de IL-10 (Figura 46B) por estas células entre os grupos analisados.

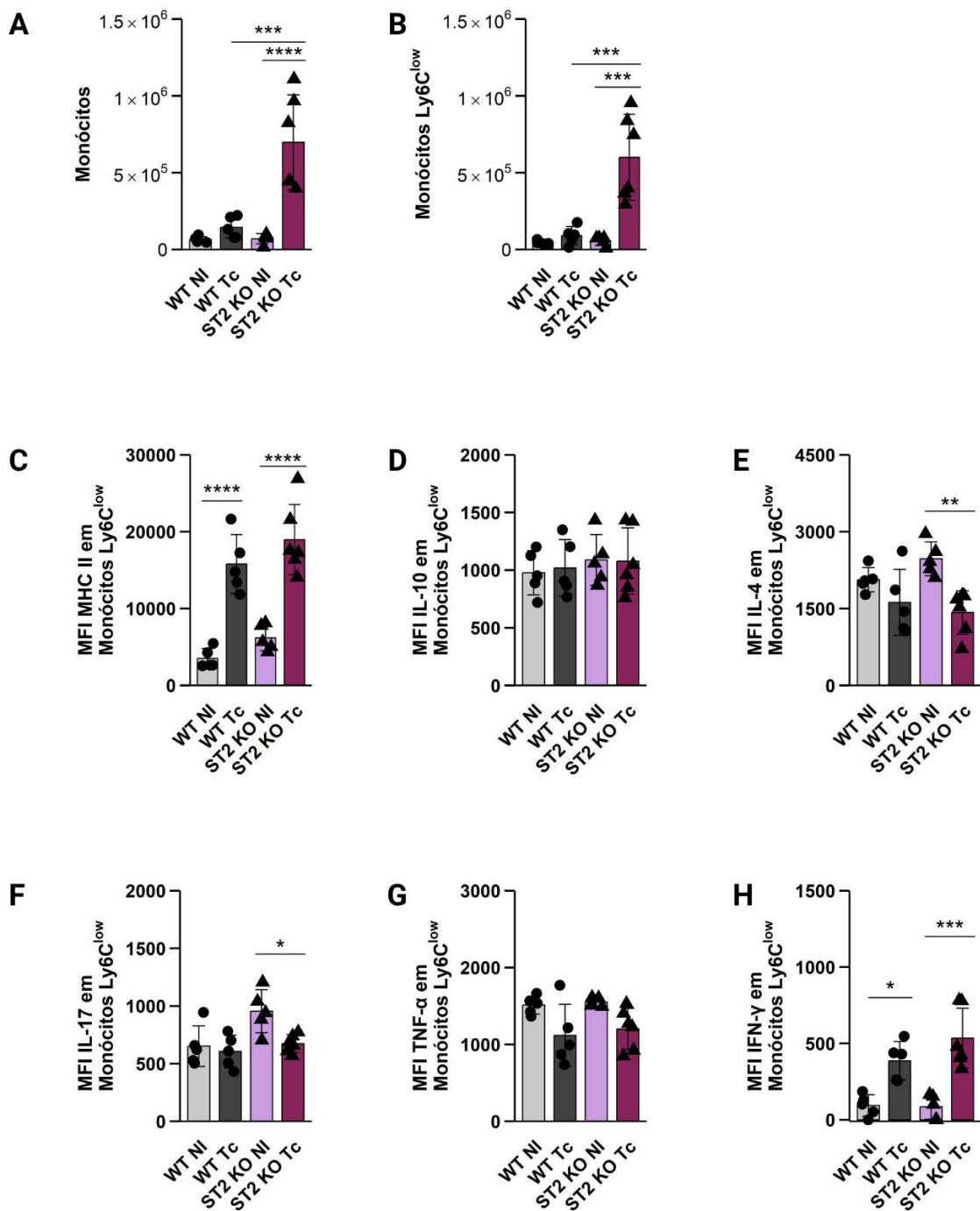


**Figura 46. Populações de macrófagos cardíacos MHC II<sup>+</sup> CCR2<sup>+</sup> presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Contagem total de macrófagos MHC II<sup>+</sup> CCR2<sup>+</sup>. (B) MFI de IL-10 em macrófagos MHC II<sup>+</sup> CCR2<sup>+</sup>. (C) MFI de IL-17 em macrófagos MHC II<sup>+</sup> CCR2<sup>+</sup>. (D) MFI de TNF- $\alpha$  em macrófagos MHC II<sup>+</sup> CCR2<sup>+</sup>. (E) MFI de IFN- $\gamma$  em macrófagos MHC II<sup>+</sup> CCR2<sup>+</sup>. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupos de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado, e entre os grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP (n 5 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

### **5.19 A deficiência no receptor ST2 induz o recrutamento de monócitos no tecido cardíaco durante a infecção aguda por *T. cruzi***

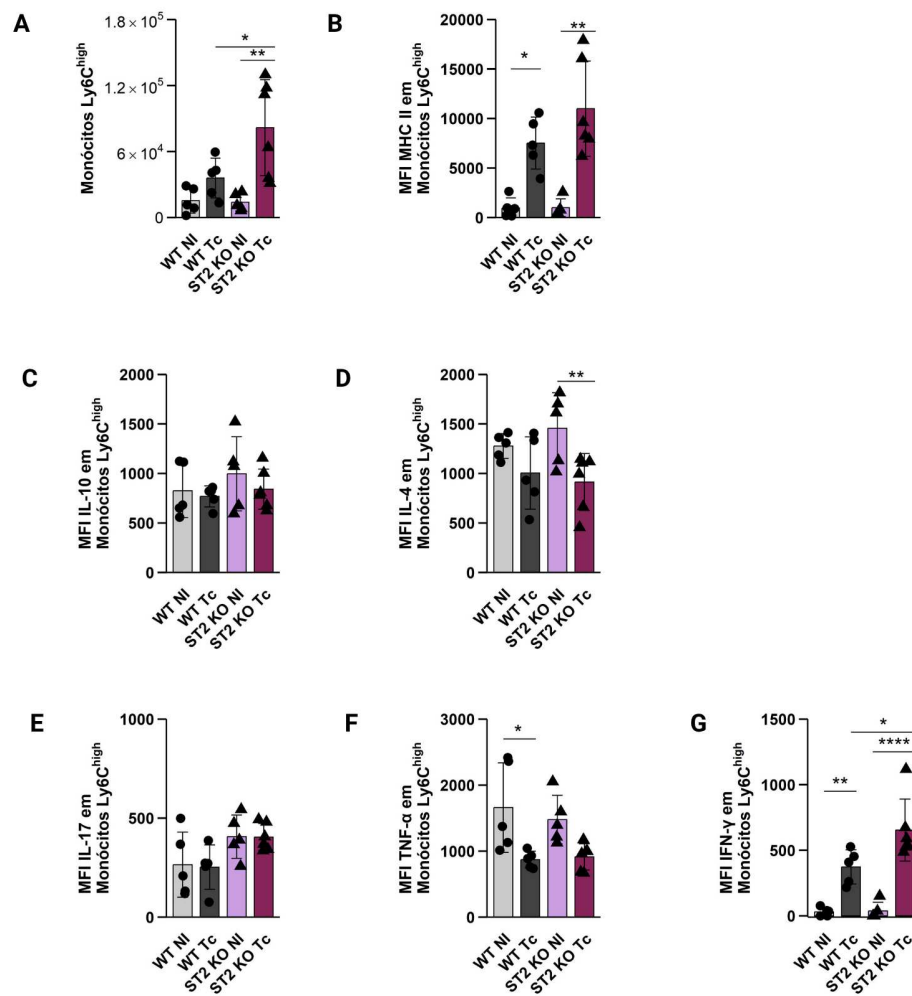
Em seguida, avaliamos se a ausência do receptor ST2 afeta a dinâmica de recrutamento de monócitos para o tecido cardíaco dos animais durante a infecção por *T. cruzi* (Figuras 47 e 48).

Inicialmente, observamos um aumento dramático de monócitos nos camundongos ST2<sup>-/-</sup> infectados, em relação a seu controle e animais selvagens infectados (Figura 47A). Sendo estes monócitos predominantemente Ly6C<sup>low</sup> (Figura 47B). Na caracterização fenotípica dos monócitos, foi demonstrado que estas células em ambas os grupos infectadas apresentam aumento na expressão de MHCII (Figura 47C) e IFN- $\gamma$  (Figura 47H) em relação aos seus respectivos controles não infectados. Além disso, foi observado que os monócitos dos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados apresentam menor expressão de IL-4 (Figura 47E) e IL-17 (Figura 47F) em comparação com seus respectivos controles não infectados. Não foram observadas alterações na expressão de IL-10 (Figura 47D) ou TNF- $\alpha$  (Figura 47G) entre os grupos analisados.



**Figura 47. Populações de monócitos presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Contagem total de monócitos. (B) Contagem de monócitos LY6C<sup>low</sup>. (C) MFI de MHC II em monócitos LY6C<sup>low</sup> (D) MFI de IL-10 em monócitos LY6C<sup>low</sup>. (E) MFI de IL-4 em monócitos LY6C<sup>low</sup>. (F) MFI de IL-17 em monócitos LY6C<sup>low</sup>. (G) MFI de TNF- $\alpha$  em monócitos LY6C<sup>low</sup>. (H) MFI de IFN- $\gamma$  em monócitos LY6C<sup>low</sup>. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado, e entre os grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP (n 5 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

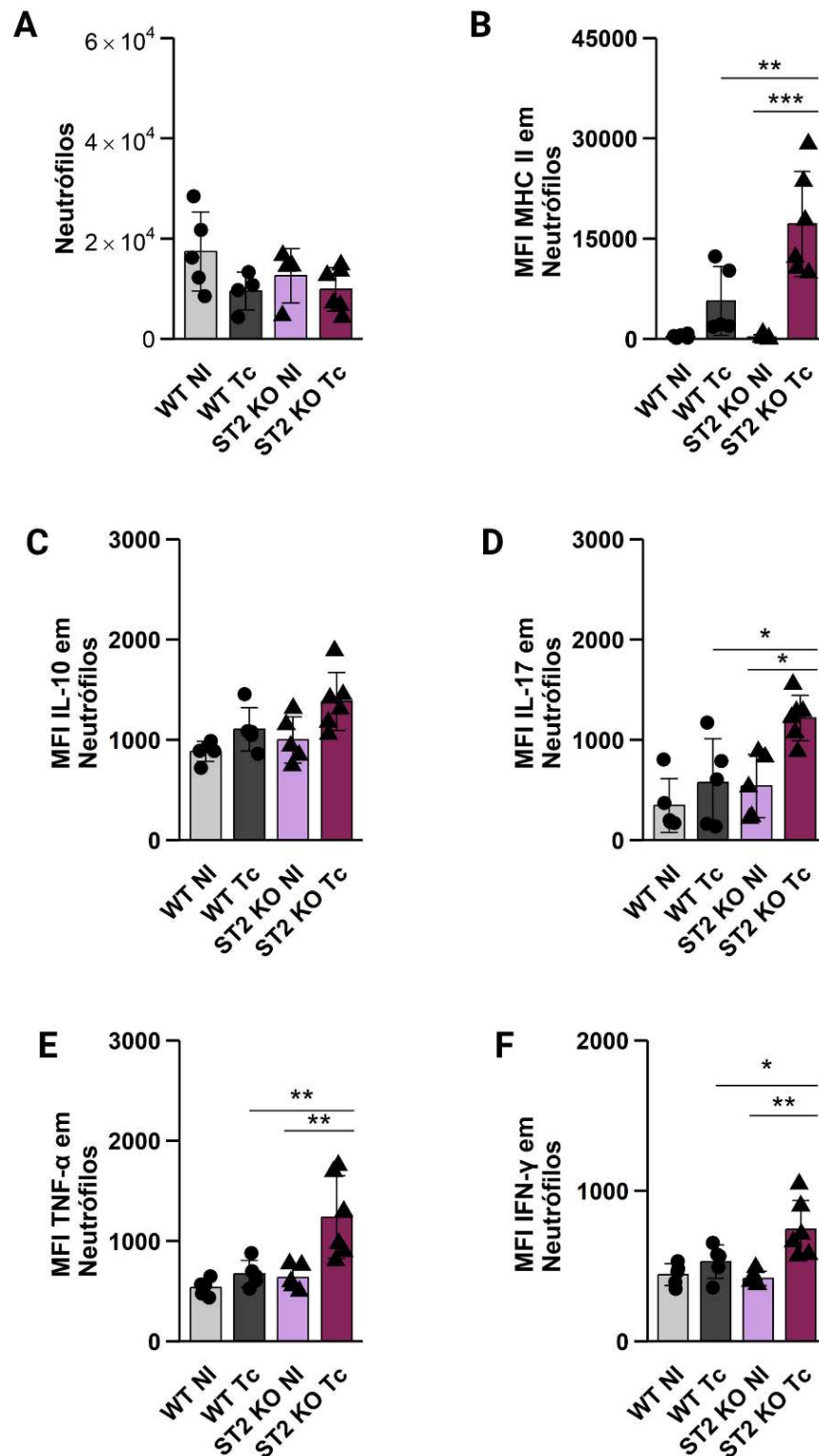
Também, analisamos o perfil dos monócitos Ly6C<sup>high</sup> na infecção por *T. cruzi* (figura 48). Os resultados mostram que houve um aumento no número dessa população de monócitos no coração dos camundongos ST2<sup>-/-</sup> infectados, em relação a seu controle e animais selvagens infectados (Figura 48A). Em relação ao fenótipo destas células, os monócitos Ly6C<sup>high</sup> de ambas os grupos infectadas apresentaram aumento significativo na expressão de MHCII (Figura 48B) e IFN- $\gamma$  (Figura 48G) em comparação com seus respectivos controles não infectados. Adicionalmente, a expressão de IFN- $\gamma$  foi maior nos monócitos dos camundongos ST2<sup>-/-</sup> infectados em comparação com animais WT infectados (Figura 48G). Observou-se também que os monócitos Ly6C<sup>high</sup> dos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados apresentaram uma redução na expressão de IL-4 em comparação com seus controles não infectados, enquanto os dos camundongos WT infectados exibiram uma redução na expressão de TNF- $\alpha$  (Figura 48F) em relação aos seus respectivos controles não infectados.



**Figura 48. Populações de monócitos Ly6C<sup>high</sup> presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e ST2<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Contagem de monócitos LY6C<sup>high</sup>. (B) MFI de MHC II em monócitos LY6C<sup>high</sup>. (C) MFI de IL-10 em monócitos LY6C<sup>high</sup>. (D) MFI de IL-4 em monócitos LY6C<sup>high</sup>. (E) MFI de IL-17 em monócitos LY6C<sup>high</sup>. (F) MFI de TNF- $\alpha$  em monócitos LY6C<sup>high</sup>. (G) MFI de IFN- $\gamma$  em monócitos LY6C<sup>high</sup>. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou ST2<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado, e entre os grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP (n 5 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001. Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

## **5.20 A ausência do receptor ST2 induz a ativação de neutrófilos durante a infecção aguda por *T. cruzi***

Avaliou-se também o perfil dos neutrófilos no tecido cardíaco dos animais infectados com *T. cruzi* (Figura 49). Embora a infecção não tenha potencializado o recrutamento de neutrófilos para o coração (Figura 49A), análises fenotípicas indicaram alterações na deficiência do receptor ST2. Foi demonstrado que os neutrófilos dos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados apresentaram maior expressão de MHCII (Figura 49B), IL-17 (Figura 49D) TNF- $\alpha$  (Figura 49E) e IFN- $\gamma$  (Figura 49F), quando comparados com seus respectivos controles não infectados e também com os animais selvagens infectados. Não foram observadas diferenças significativas na expressão de IL-10 (Figura 49C) entre nenhum dos grupos analisados.

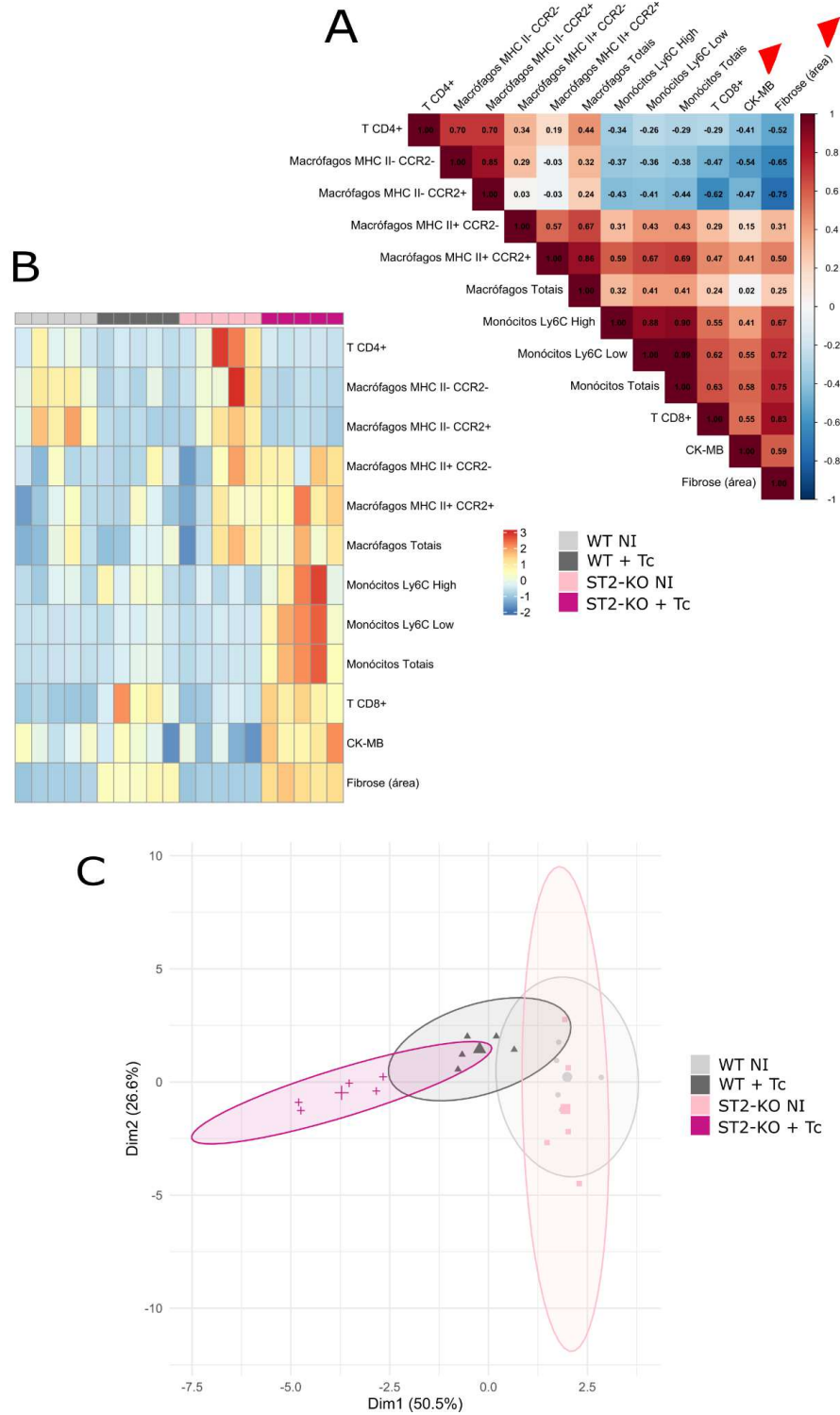


**Figura 49. Populações de neutrófilos presentes no tecido cardíaco de animais BALB/c e *ST2*<sup>-/-</sup>, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** (A) Contagem de neutrófilos. (B) MFI de MHC II em neutrófilos. (C) MFI de IL-10 em neutrófilos. (D) MFI de IL-17 em neutrófilos. (E) MFI de TNF-α em neutrófilos. (F) MFI de IFN-γ em neutrófilos. As análises estatísticas foram realizadas entre cada grupo de camundongo (WT ou *ST2*<sup>-/-</sup>) com seu grupo não infectado, e entre os grupos no mesmo momento da infecção. Os dados são expressos como médias ± DP (n 5 - 6 animais). Resultados considerados significantes com \**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01, \*\*\**p* < 0,001 e \*\*\*\**p* < 0,0001. Dados analisados usando One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

Para compreender o papel do receptor ST2 na modulação da resposta imune e da patologia cardíaca durante a infecção por *T. cruzi* (20 dpi), realizamos uma análise multifatorial integrando as principais populações de células imunes no coração, um marcador de dano miocárdico (CK-MB) e a quantificação de fibrose tecidual (morfometria). O correlograma (Figura 50A) revelou uma forte assinatura inflamatória associada ao dano tecidual. Observamos uma correlação positiva robusta entre os níveis de CK-MB, a área de fibrose, a população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e os monócitos, principalmente aqueles com fenótipo Ly6C<sup>Low</sup>. O envolvimento destes elementos também é ilustrado no heatmap (Figura 50B). A intensidade das cores quentes para as variáveis referentes a monócitos, T CD8<sup>+</sup>, CK-MB e fibrose é visivelmente maior no grupo ST2-KO infectado em comparação com o WT + Tc. Isso indica, que na ausência da sinalização via ST2, a infecção por *T. cruzi* desencadeia uma resposta inflamatória exacerbada, com maior recrutamento de destas populações, resultando em maior dano ao miocárdio e, conseqüentemente, em uma fibrose mais acentuada.

Para consolidar a análise e compreender o impacto global da infecção e da ausência do receptor ST2, realizamos uma Análise de Componentes Principais (PCA) (Figura 50C). No primeiro componente principal (Dim1), os grupos não infectados (WT NI e ST2-KO NI) agruparam-se coesamente em scores, indicando um fenótipo basal de homeostase. Em contrapartida, a infecção por *T. cruzi* induziu uma profunda alteração neste perfil, deslocando ambos os grupos infectados, representando o estabelecimento de um ambiente inflamatório e de dano tecidual. Contudo, grupo ST2-KO + Tc formou um cluster distinto, posicionado em scores mais distantes em Dim1 em comparação ao grupo WT + Tc. Essas observações indicam um perfil imunopatológico exacerbado, refletindo diretamente os níveis mais elevados de células T CD8<sup>+</sup>, CK-MB e fibrose, como demonstrado no heatmap.

Em conjunto, a análise multivariada demonstra que o receptor ST2 atua como um componente regulatório crucial, protegendo o coração de uma imunopatologia excessiva durante a infecção por *T. cruzi*. A sua ausência, conforme visualizado pelo posicionamento do grupo ST2-KO+Tc no PCA, promove resposta inflamatória deletéria que culmina em um quadro de cardiomiopatia mais grave.



**Figura 50. Análise integrada da resposta imune e do dano cardíaco em camundongos deficientes para ST2 infectados com *T. cruzi*.** Análise multidimensional do infiltrado imune, do dano miocárdico (CK-MB) e da fibrose (em destaque) no tecido cardíaco de camundongos selvagens (WT) e knockout para o receptor ST2 (ST2-KO), não infectados (NI) ou na fase aguda da infecção por *T. cruzi* (Tc). (A) Correlograma de Spearman mostrando as correlações entre as populações celulares, CK-MB e fibrose. A cor e o tamanho dos quadrados indicam a força da correlação (vermelho para positivo, azul para negativo). Os valores de correlação ( $r$ ) são mostrados. (B) Heatmap representando as variáveis analisadas para cada grupo experimental. Cores quentes (vermelho) indicam valores acima da média (superexpressão), enquanto cores frias (azul) indicam valores abaixo da média (subexpressão). (C) Análise de Componentes Principais (PCA) baseada em todas as variáveis. Cada ponto representa um animal e as elipses indicam o intervalo de confiança de 95% para cada grupo. Os eixos representam os dois primeiros componentes principais (Dim1 e Dim2).

## 6 DISCUSSÃO

A DC é uma doença negligenciada que afeta milhões de pessoas globalmente. A infecção induz morbidade duradoura e disfunção tecidual progressiva, associada principalmente à resposta inflamatória desencadeada pelo hospedeiro (WHO, 2024). A progressão da DC está intimamente ligada ao equilíbrio entre a resposta imune do hospedeiro e a dinâmica de parasitismo do *T. cruzi* (Magalhães et al., 2022; Torres et al., 2022). Recentemente, mecanismos da persistente ativação celular observada na DC crônica foi relacionada com o parasitismo tissular ou antígenos do protozoário presentes no organismo do hospedeiro (Almeida et al., 2022). Além disso, elementos da resposta imunológica mediada por IFN- $\gamma$  são regulados positivamente em células T CD4+ durante a cardiomiopatia chagásica, sugerindo a participação de uma imunidade Th1 na progressão da doença e o desenvolvimento de miocardite (Gomes et al., 2005; Roffe et al., 2019). Nesse sentido, o equilíbrio de respostas imunes inflamatórias e regulatórias na fase inicial da DC é crucial para um curso crônico assintomático da doença (Sathler-Avelar et al., 2021).

Neste contexto, a via IL-33/ST2 emerge como um modulador imunológico central. A IL-33, uma citocina com função de alarmina, é liberada após dano tecidual e sinaliza através do receptor ST2, desencadeando atividades pleiotrópicas que podem ser tanto protetoras quanto patológicas (Liew et al., 2016). No coração, por exemplo, a IL-33 pode inibir o desenvolvimento de miocardite infecciosa via regulação da resposta Th1, potencializando a produção de IL-4 por macrófagos cardíacos e linfócitos T CD4+ (Wang et al., 2017). Deficiências nesse eixo têm sido associadas ao desenvolvimento de respostas Th1 e Th17 desreguladas, além da supressão da resposta de células T regulatórias. Durante a infecção por *T. cruzi*, o eixo IL-33/ST2 parece desempenhar um papel na regulação da resposta inflamatória e no controle do parasitismo; contudo, seu papel no desenvolvimento de patogêneses e na progressão da infecção aguda ainda é incerto (Medeiros et al., 2019; Oliveira et al., 2022; Boccardo et al., 2025).

Com o objetivo de caracterizar o papel da via de sinalização IL-33/ST2 na progressão da infecção experimental por *T. cruzi*, acompanhamos animais selvagens e deficientes para o receptor ST2 infectados com a cepa Y. Inicialmente, avaliamos o perfil de parasitemia e o desenvolvimento de aspectos clínicos gerais induzidos durante a infecção. Observamos que, embora haja uma redução inicial da parasitemia nos camundongos ST2<sup>-/-</sup>, os níveis de parasitos sanguíneos convergiram aos dos animais WT, igualando-se no 9 dpi. Este achado

sugere que, no nosso modelo, a via IL-33/ST2 não desempenha um papel central no controle da parasitemia causada pela infecção com a cepa Y de *T. cruzi*. A ausência de um impacto direto da via IL-33/ST2 sobre os níveis de parasitemia é uma característica também encontrada em infecções como a malária por *P. berghei*. Neste modelo, o eixo IL-33/ST2 não influencia os níveis de parasitemia, mas é essencial na regulação do desenvolvimento de patologias (Besnard et al 2015; Reverchon et al., 2017).

Além disso, foi evidenciado que a ausência de ST2 parece melhorar alguns aspectos clínicos da infecção, incluindo a manutenção do peso corporal, comportamento alimentar sustentado e escore clínico. Esses achados, contudo, contrastam com os resultados observados na avaliação das patogêneses, onde encontramos inflamação e danos teciduais exacerbados nos camundongos ST2<sup>-/-</sup> infectados, em comparação aos WT, incluindo prejuízos à função hepática, motilidade intestinal e disfunção elétrica cardíaca. A manutenção do peso corporal pode ser na verdade um reflexo da intensa esplenomegalia e hepatomegalia observadas nesses animais. O escore clínico reflete a observação do estado físico-comportamental do camundongo, incluindo exploração, movimentação e anedonia. Sabe-se que a infecção por *T. cruzi* induz alterações comportamentais em humanos e animais, incluindo comportamento do tipo ansioso-depressivo (Vilar-Pereira et al., 2012; Serrano et al., 2025). Dados não mostrados neste trabalho indicam que camundongos deficientes para o receptor ST2 não desenvolvem os déficits cognitivos característicos da DC, um fenômeno similar ao observado na malária cerebral murina, que é dependente da neuroinflamação mediada por células ST2<sup>+</sup> (Reverchon et al., 2017). Além disso, a neuroinflamação induzida pelo *T. cruzi* pode induzir a expressão de citocinas no cérebro, como a IL-17, que atua no hipotálamo suprimindo o comportamento alimentar (Nogueira et al., 2020). Diante desses fatos, hipotetizamos que a preservação cerebral observada nos camundongos ST2<sup>-/-</sup> está relacionada com a manutenção do estado físico-comportamental e alimentar encontrado nesses animais, em relação aos WT infectados. Apesar disso, a exacerbação de patologias teciduais observadas nos animais ST2<sup>-/-</sup> não foi isenta de manifestações clínicas, como podemos observar nos dados de sobrevivência, com os camundongos KO desenvolvendo mortalidade precoce (início no 17 dpi) em relação aos WT.

Atualmente, no Brasil, a transmissão oral por *T. cruzi* representa a principal via de infecção. A infecção oral é caracterizada por lesões hepáticas e níveis séricos de enzimas hepáticas exacerbadas (Barreto-de-Albuquerque et al., 2015; Silva et al., 2024). O fígado é um órgão-alvo na DC, sendo essencial para a manutenção da homeostase do hospedeiro, além de crítico para o controle do parasitismo sanguíneo e tissular (Sardinha et al., 2010). Nesse contexto, compreender as alterações hepáticas associadas à infecção torna-se essencial. Em

nosso modelo, observamos inflamação hepática exacerbada nos camundongos ST2<sup>-/-</sup>, marcada pelo acúmulo de células inflamatórias, aumento da atividade de NAG, hepatomegalia e elevação significativa dos níveis séricos de ALT e albumina. Diferente do que ocorre em modelos típicos de hepatite, onde há consumo de proteínas plasmáticas, os dados sustentam a hipótese de que a inflamação exacerbada nos camundongos ST2<sup>-/-</sup> levou ao desenvolvimento de um estado de desidratação. Nesse cenário, o aumento da concentração sérica de albumina provavelmente reflete uma redução do volume plasmático (hemoconcentração), em vez de um aumento na sua síntese, considerando que o estado de hidratação é um determinante crítico na interpretação dos níveis dessa proteína durante processos agudos (Gatta et al., 2012). Corroborando essa ideia, a diminuição da umidade fecal observada nos animais KO infectados sugere uma tentativa do organismo de conservar fluidos por meio da intensificação da reabsorção de água no cólon, um mecanismo compensatório durante a desidratação sistêmica (Kunzelmann; Mall, 2002). Esses achados reforçam o papel central do eixo IL-33/ST2 na proteção contra inflamação hepática desorganizada. Trabalhos anteriores apontaram que IL-33 pode ter efeito protetor no fígado, atenuando fibrose e inflamação em contextos não infecciosos; aqui, nossos dados indicam que, durante a infecção por *T. cruzi*, essa via também desempenha função homeostática.

A intensificação da inflamação hepática observada nos camundongos ST2<sup>-/-</sup> sugere que, embora essa resposta possa contribuir para o controle inicial da infecção, ela também pode comprometer a integridade funcional do tecido. Em camundongos deficientes em IL-33 infectados com *Leishmania donovani*, foi descrita uma resposta Th1 exacerbada no fígado, com intenso recrutamento mielóide e redução da carga parasitária (Rostan et al., 2013). Durante a infecção por *T. cruzi*, podemos observar desregulações hepáticas como hipoglicemia, devido à gliconeogênese hepática defeituosa (Nagajyothi et al., 2013). Essas alterações têm valor preditivo no aumento da mortalidade (Combs et al., 2005; Hölscher et al., 2000), ressaltando o papel central do fígado na manutenção da homeostase.

A fibrose é uma consequência da inflamação persistente e do dano tecidual crônico, resultando em uma cicatrização excessiva (Seki & Brenner, 2015; Aydin & Akçali, 2018). No contexto da DC, sabemos que a fibrose ocorre devido ao dano tecidual exacerbado e à intensa infiltração celular. Nossos dados mostram maior acúmulo de macrófagos, e dano hepático, observado pelo aumento nos níveis de marcadores da função hepática. A via IL-33/ST2 tem sido associada à maior morbidade em vários modelos de doenças fibrosantes, como fibrose hepática induzida por tioacetamida e por CCl<sub>4</sub> (tetracloreto de carbono), e a esquistossomose (Liu et al. 2012; Mchedlidze et al. 2013). O papel do eixo IL-33/ST2 na organização de

respostas teciduais é bem documentado em modelos de infecção parasitária, como na esquistossomose mansônica, onde a deficiência de ST2 leva à formação de granulomas hepáticos desorganizados (Maggi et al., 2023). Contudo, a função desta via na DC permanecia inexplorada. Nossos resultados mostram que a ausência de ST2 também culmina em um agravamento da fibrose hepática e em desorganização da matriz colagênica no coração. Este padrão estabelece um claro paralelo entre as duas doenças, sugerindo que a sinalização via ST2 possui um papel conservado na orquestração de respostas reparativas eficazes, garantindo não apenas a contenção do dano, mas também a preservação da arquitetura tecidual.

O fígado desempenha um papel central no processamento de nutrientes e toxinas, estando intimamente conectado ao trato gastrointestinal por meio da circulação portal e do sistema biliar. As alterações hepáticas significativas observadas na ausência de ST2 podem, portanto, ter consequências importantes para a homeostase intestinal. O eixo IL-33/ST2 é essencial para o controle de helmintos intestinais, eliminação de bactérias patogênicas na mucosa intestinal, indução da proliferação de células epiteliais e a produção de muco, contribuindo para uma resposta imune eficiente (Pastorelli et al., 2013; Lopetuso et al., 2012). No entanto, o papel desta via em lesões intestinais causadas por protozoários ainda não está completamente elucidado. No contexto da toxoplasmose, o eixo IL-33/ST2 demonstrou um papel prejudicial, potencializando o desenvolvimento de ileíte (Ryffel et al., 2019). Em animais deficientes para IL-33, observou-se uma atenuação da patologia intestinal, associada à diminuição da citocina protetora IL-22 e ao recrutamento de neutrófilos.

Em nosso estudo, observamos infiltrados inflamatórios no tecido intestinal dos animais KO infectados já ao 7 dpi, além do posterior acúmulo de macrófagos. Adicionalmente, houve prolongamento do tempo de trânsito intestinal e redução da porcentagem de água nas fezes. Essas alterações denotam um cenário de disfunção intestinal na ausência do receptor ST2. Manifestações gastrointestinais, como megacólon e megaesôfago, são características da fase crônica da DC em humanos e estão intrinsecamente ligadas à redução da motilidade intestinal. Embora a desnervação causada pelo parasito seja classicamente apontada como o principal fator etiológico dessas alterações (Köberle, 1968), o papel da inflamação persistente como indutora da disfunção tecidual não deve ser subestimado (Jabari et al., 2020). Fenômenos similares de intenso recrutamento celular e prejuízo funcional foram observados no fígado desses mesmos animais, indicando que a ausência de ST2 parece desencadear uma resposta inflamatória exacerbada em múltiplos órgãos alvo durante a infecção aguda por *T. cruzi*.

Para caracterizar a resposta inflamatória orquestrada na ausência do receptor ST2, analisamos o perfil celular no baço dos animais infectados. No 7dpi, detectamos um perfil inflamatório acentuado, caracterizado por um aumento na intensidade média integrada de linfócitos T CD8<sup>+</sup> produzindo TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , e de linfócitos T CD4<sup>+</sup> produzindo IFN- $\gamma$ , em comparação com os animais selvagens infectados. O IFN- $\gamma$  é crucial no controle da replicação do *T. cruzi* (Silva et al., 1995; Nabors et al., 1995). Portanto, o aumento da produção desta citocina pelos linfócitos T esplênicos nos animais ST2<sup>-/-</sup> poderia explicar a redução da parasitemia observada no 7 dpi. Entretanto, é importante destacar que o baço representa um sítio de expansão e ativação dessas células T produtoras de citocinas inflamatórias, que posteriormente podem migrar para os órgãos-alvo, como o coração. Embora o IFN- $\gamma$  seja essencial para a defesa do hospedeiro, sua produção excessiva ou desregulada está associada ao desenvolvimento de patogêneses na DC (Michailowsky et al., 2001; Roffê et al., 2009). Assim, a expansão esplênica de células T produtoras de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e a possível migração destas células para demais tecidos podem ser fatores centrais na indução do dano tissular precoce observado no coração e na intensificação da inflamação nos demais órgãos avaliados nos animais ST2<sup>-/-</sup>.

A redução inicial da parasitemia nos ST2 KO no 7 dpi não se sustentou, igualando-se aos níveis dos animais WT rapidamente. Isso ocorre apesar da persistência de um ambiente rico em IFN- $\gamma$ , como sugerido pelos nossos dados de citometria do coração. É possível que a inflamação mediada pelo IFN- $\gamma$  tenha maior impacto tecidual nos animais ST2<sup>-/-</sup>, em relação ao impacto sistêmico. Na infecção por *T. brucei*, embora a citocina IL-17 seja essencial para a redução do parasitismo tecidual e o desenvolvimento de inflamação tissular, não apresenta nenhum papel no controle da parasitemia (Sinton et al., 2023). Além disso, a eficácia do IFN- $\gamma$  no controle do *T. cruzi* pode depender do microambiente tecidual (Unanue, 1997; Cunha et al., 2005).

O baço é um reservatório e centro de mobilização de monócitos durante a inflamação (Swirski et al., 2009). Observamos que o eixo IL-33/ST2 tem papel central neste processo, como evidenciado pelo aumento no número de monócitos nos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados em comparação com os controles. No entanto, esses monócitos apresentaram uma redução na produção de IL-12 em relação aos monócitos de animais WT infectados. A IL-12 é uma citocina fundamental para a diferenciação e manutenção de respostas Th1, incluindo a produção de IFN- $\gamma$  por células T (Trinchieri, 1995). Desse modo, hipotetizamos que a IL-12 produzida foi rapidamente consumida para impulsionar a precoce resposta Th1 inicial observada nos linfócitos dos animais ST2<sup>-/-</sup>. Outra hipótese seria a indução de um *feedback*

negativo induzido pelo próprio ambiente hiperinflamatório. Altas concentrações de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  podem inibir a produção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos, atuando como um mecanismo de autorregulação para limitar a inflamação e o dano tecidual excessivo (Hayes et al., 1995; Ma, 2001). Portanto, é plausível que o perfil pró-inflamatório que detectamos em algumas populações celulares dos animais ST2<sup>-/-</sup> tenha exercido um efeito supressor sobre a capacidade dos monócitos de sustentar a produção de IL-12. Por meio da análise do t-SNE, observamos clusters com alta expressão de CD69 nos ST2 KO infectados, embora isso não tenha se refletido em diferenças estatísticas significativas. Esse achado pode ser atribuído ao momento inicial da infecção em que a análise foi realizada, sugerindo que esses clusters ainda estavam em expansão inicial. Estudos futuros poderão esclarecer se essas populações celulares desempenham papéis mais proeminentes em estágios avançados da infecção.

A miocardite é a principal causa de morbidade e mortalidade na DC. A intensidade da inflamação e do dano miocárdico na fase aguda são considerados fatores prognósticos importantes (Marin-Neto et al., 2007; Rassi Jr et al., 2012). Nossos achados de miocardite precoce (7 dpi), níveis elevados de CK-MB (7 e 20 dpi), desenvolvimento fibrose cardíaca desorganizada e alterações eletrocardiográficas mais pronunciadas nos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados, apontam para um papel crucial da via IL-33/ST2 na proteção do coração durante a infecção aguda por *T. cruzi*. As alterações no eletrocardiograma dos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados, sugerem um comprometimento mais extenso, afetando a condução atrial e ventricular, similar ao observado em modelos de miocardite chagásica aguda severa (Sales et al., 2022).

Para entender os mecanismos celulares subjacentes ao dano cardíaco observado nos animais ST2<sup>-/-</sup>, investigamos o perfil do infiltrado inflamatório no coração aos 20 dpi. Em condições homeostáticas, o coração apresenta uma tímida população de monócitos, sendo os macrófagos tissulares residentes as principais células imunes (Hulsmans et al., 2016). Esses macrófagos residentes, com distintos perfis de expressão de MHCII e CCR2, desempenham papéis na resposta inicial a patógenos (Epelman et al., 2014). Durante a injúria cardíaca, macrófagos cardíacos MHC II<sup>+</sup> CCR2<sup>+</sup> medeiam o influxo cardíaco de monócitos a partir da circulação e do baço. Esses monócitos recrutados são frequentemente associados a um papel patológico, contribuindo para a expansão do infarto, disfunção ventricular e progressão da doença cardiovascular (Nahrendorf et al., 2007; Bajpai et al., 2019).

Observamos que os macrófagos residentes MHC II<sup>-</sup> CCR2<sup>-</sup>, associados a funções de homeostase e regulação (Epelman et al., 2014), exibiram uma redução na produção de IL-17 em ambos os grupos infectados. Contudo, nos animais ST2<sup>-/-</sup>, essas células passaram a

produzir níveis elevados de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Além disso, observamos a expansão de macrófagos MHC II + CCR2+ nos camundongos KO infectados. A análise de t-SNE forneceu uma visão mais refinada, onde foram identificadas duas subpopulações de macrófagos MHC II + CCR2+. Nos animais selvagens, predominava uma população que expressava CX3CR1 e exibia baixa expressão de citocinas. A expressão de CX3CR1 é frequentemente associada a macrófagos com funções de patrulhamento e perfil resolutivo (Jung et al., 2000; Prinz et al., 2012). Em contraste, nos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados, a população predominante de macrófagos MHC II+ CCR2+ apresentava baixa expressão de CX3CR1 e alta expressão de IFN- $\gamma$ , um perfil característico de células recém-recrutadas e patogênicas (Lavine et al., 2014). A expansão da população de macrófagos duplo-positivos é consistente com o recrutamento dramático de monócitos no coração dos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados. O aumento de monócitos Ly6C<sup>high</sup> expressando IFN- $\gamma$  é crítico, dado seu papel patológico na promoção de dano tecidual cardíaco (Nahrendorf et al., 2007).

Em nosso modelo, observamos um aumento de linfócitos T CD8+ no coração dos animais ST2<sup>-/-</sup> infectados, marcados por alta expressão de IFN- $\gamma$ . Embora a frequência de linfócitos T CD4+ estivesse diminuída no coração desses animais, as células CD4+ presentes eram multifuncionais, co-expressando IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Esse perfil sugere um ambiente tecidual multifuncional, principalmente por respostas Th1. Além disso, os neutrófilos presentes no coração dos ST2<sup>-/-</sup> infectados também mostraram um perfil mais ativado, com aumento da expressão de MHC II e produção de IFN- $\gamma$ . Em contraste, embora a infecção tenha induzido um aumento nas populações de células T  $\gamma\delta$ +, o eixo IL-33/ST2 não pareceu influenciar profundamente na dinâmica dessas células no coração.

Estudos apontam para um papel protetor da IL-17 na cardiomiopatia chagásica, onde esta citocina parece regular a diferenciação de células Th1, possivelmente através da redução da produção de IL-12 e, conseqüentemente, de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , controlando o recrutamento celular para o tecido cardíaco (Guedes et al., 2010, Magalhães et al., 2013). De maneira geral, no coração, observamos a diminuição da expressão de IL-17 em macrófagos e linfócitos dos animais infectados. Apesar do quadro de miocardite severa, a expressão intracelular de TNF- $\alpha$  por populações como monócitos e linfócitos T CD8+ também estava diminuída nos animais infectados em comparação aos seus controles não infectados. Esta observação sugere que o ambiente tecidual aos 20 dpi, rico em IFN- $\gamma$ , exerça um feedback negativo sobre o TNF- $\alpha$ , um mecanismo de regulação já descrito para limitar a inflamação excessiva (Ma, 2001). Adicionalmente, a cinética de produção de citocinas deve ser considerada. Em modelos de miocardite, o pico de produção de TNF- $\alpha$ , uma citocina de resposta rápida, pode ocorrer em

um estágio mais precoce da infecção (Huber et al., 1994). Recentemente, o mecanismo de cinética do TNF- $\alpha$  no coração foi melhor elucidado, envolvendo a regulação via nervo vago (Li et al., 2025)

Coletivamente, estes achados sugerem que a sinalização via ST2 é fundamental para manter o fenótipo regulatório das células imunes durante a infecção, e sua ausência permite o desenvolvimento de ambiente pró-inflamatório, mediado principalmente pela expressão de IFN- $\gamma$ . Recentemente, Boccardo e colaboradores (2025), evidenciaram que a infecção aguda por *T. cruzi* leva a uma diminuição dos níveis sistêmicos de IL-33 e a uma consequente redução das células T regulatórias de reparo tecidual (trTregs). Similar ao observado em nossos achados, a resposta Th1/IFN- $\gamma$  suprime mecanismos de regulação, contribuindo para o desenvolvimento de patologia.

A gravidade da miocardite na fase aguda da Doença de Chagas é um fator determinante para a progressão e severidade da cardiopatia chagásica crônica (Rassi Jr et al., 2012; Malik et al., 2015). A intensidade da resposta inflamatória durante a fase inicial estabelece o cenário para o desenvolvimento de fibrose, remodelamento cardíaco e disfunção contrátil persistente. Nossos dados, demonstrando uma infecção aguda mais severa nos camundongos ST2<sup>-/-</sup>, caracterizada por inflamação miocárdica, dano celular, alterações eletrocardiográficas e fibrose desorganizada, sugerem que a ausência da sinalização via ST2 pode predispor a um desenvolvimento mais rápido e grave da cardiomiopatia chagásica crônica. Acompanhar o desenvolvimento da infecção por *T. cruzi* nos camundongos ST2<sup>-/-</sup> por períodos mais longos seria crucial para entender se as alterações agudas que observadas refletem em diferenças significativas no dano e disfunções teciduais observados, oferecendo um novo alvo terapêutico potencial para modular a progressão da doença.

## 7 CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste trabalho permitem concluir que o receptor ST2 desempenha um papel crucial na modulação da resposta inflamatória do hospedeiro à infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi*. Sua ausência resulta em uma inflamação exacerbada, mediada principalmente por IFN- $\gamma$ , culminando em danos teciduais severos e disfunção de múltiplos órgãos, com destaque para o desenvolvimento de uma miocardite precoce e severa.

Assim, o receptor ST2 se estabelece como um regulador essencial da homeostase tecidual durante a infecção aguda. A modulação terapêutica da via IL-33/ST2 surge como uma estratégia promissora para conter a imunopatologia severa e, possivelmente, favorecer uma evolução menos agressiva da doença de Chagas..

## 8 REFERÊNCIAS

- ABSTON, E. D. et al. Th2 regulation of viral myocarditis in mice: different roles for TLR3 versus TRIF in progression to chronic disease. **Clinical & Developmental Immunology**, v. 2012, p. 129486, 2012.
- ALI, S. et al. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 47, p. 18660–18665, 2007.
- ALMEIDA, G. G. et al. Chagasic cardiomyopathy is marked by a unique signature of activated CD4<sup>+</sup> T cells. **Journal of Translational Medicine**, v. 20, n. 1, p. 551, 2022.
- ALVES, C. R. et al. *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 44–52, 2007.
- ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas disease. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 71–80, 1999.
- ANTINORI, S. et al. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. **European Journal of Internal Medicine**, v. 43, p. 6–15, 2017.
- AYIMBA, E. et al. Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 166, n. 2, p. 218–226, 2011.
- BAE, S. et al. Contradictory Functions (Activation/Termination) of Neutrophil Proteinase 3 Enzyme (PR3) in Interleukin-33 Biological Activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 11, p. 8205–8213, 2012.
- BAEKKEVOLD, E. S. et al. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. **The American Journal of Pathology**, v. 163, n. 1, p. 69–79, 2003.
- BAFICA, A. et al. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 177, n. 6, p. 3515–3519, 2006.
- BAJPAI, G. et al. Tissue Resident CCR2<sup>-</sup> and CCR2<sup>+</sup> Cardiac Macrophages Differentially Orchestrate Monocyte Recruitment and Fate Specification Following Myocardial Injury. **Circulation Research**, v. 124, n. 2, p. 263–278, 2019.
- BARRETO-DE-ALBUQUERQUE, J. et al. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection?. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003849, 2015.

- BELKINA, A. C. et al., Automated optimized parameters for T-distributed stochastic neighbor embedding improve visualization and analysis of large datasets. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2019.
- BERGERS, G. et al. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. **The EMBO journal**, v. 13, n. 5, p. 1176–1188, 1994.
- BERN, C. et al. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. **JAMA**, v. 298, n. 18, p. 2171–2181, 2007.
- BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 49, n. 5, p. e52-54, 2009.
- BESNARD, A.-G. et al. IL-33-mediated protection against experimental cerebral malaria is linked to induction of type 2 innate lymphoid cells, M2 macrophages and regulatory T cells. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 2, p. e1004607, 2015.
- BLOM, L.; POULSEN, L. K. IL-1 family members IL-18 and IL-33 upregulate the inflammatory potential of differentiated human Th1 and Th2 cultures. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 189, n. 9, p. 4331–4337, 2012.
- BŁYSZCZUK, P. Myocarditis in Humans and in Experimental Animal Models. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 6, p. 64, 2019.
- BOCCARDO, S. et al. Dynamics of tissue repair regulatory T cells and damage in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS pathogens**, v. 21, n. 1, p. e1012906, 2025.
- BONNEY, K. M. et al. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annual Review of Pathology**, v. 14, p. 421–447, 2019.
- BORGES, C. R. B. et al. Papel do óxido nítrico no desenvolvimento de lesões cardíacas na fase aguda da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 170–174, 2009.
- BOSCARDIN, S. B. et al. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 6B, p. 1373–1384, 2010.
- BOURGEOIS, E. et al. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 4, p. 1046–1055, 2009.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 4, p. 389–396, 1962.

CAETANO, B. C. et al. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 187, n. 4, p. 1903–1911, 2011.

CAMPOS, M. A. et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 167, n. 1, p. 416–423, 2001.

CAMPOS, M. A. et al. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 172, n. 3, p. 1711–1718, 2004.

CARDILLO, F. et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 1, p. 128–134, 1996.

CARDOSO, C. S. et al. Beneficial effects of benznidazole in Chagas disease: NIH SaMi-Trop cohort study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 11, p. e0006814, 2018.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. **Acta Tropica**, v. 151, p. 103–115, 2015.

CARRIERE, V. et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 1, p. 282–287, 2007.

CARROLL, R. W. et al. A Rapid Murine Coma and Behavior Scale for Quantitative Assessment of Murine Cerebral Malaria. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, p. e13124, 2010.

CASTRO, D. P. et al. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. **Experimental Parasitology**, v. 117, n. 2, p. 201–207, 2007.

CAYROL, C.; GIRARD, J.-P. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. **Current Opinion in Immunology**, v. 31, p. 31–37, 2014.

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

CHADALAWADA, S. et al. Mortality risk in chronic Chagas cardiomyopathy: a systematic review and meta-analysis. **ESC Heart Failure**, v. 8, n. 6, p. 5466–5481, 2021.

- CHAVES, G. C. et al. Estimating demand for anti-Chagas drugs: a contribution for access in Latin America. **Revista Panamericana De Salud Publica = Pan American Journal of Public Health**, v. 41, p. e45, 2017.
- CHEN, H. et al. Cytokit: a bioconductor package for an integrated mass cytometry data analysis pipeline. **PLoS computational biology**, v. 12, n. 9, p. e1005112, 2016.
- CHOI, Y. J. et al. Dysbiosis of Fecal Microbiota From Complement 3 Knockout Mice With Constipation Phenotypes Contributes to Development of Defecation Delay. **Frontiers in Physiology**, v. 12, 2021.
- COMBS, T. P. et al. The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 24085–24094, 2005.
- CORINNE CAYROL; JEAN-PHILIPPE GIRARD. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family, v. 281, p. 154–168, 2018.
- COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl 1, p. 113–122, 2007.
- CUCUNUBÁ, Z. M. et al. The epidemiology of Chagas disease in the Americas. **Lancet Regional Health. Americas**, v. 37, p. 100881, 2024.
- DA SILVA, H. F. L. et al. Impact of gastrointestinal inoculation and benznidazole treatment on infection by *Trypanosoma cruzi* (Y strain, DTU TcII) in Swiss mice. **Experimental Parasitology**, v. 265, p. 108810, 2024.
- DAMASIO, M. P. S. et al. PD1 and PDL1 molecules control suppressor activity of regulatory T cells in chronic Chagas cardiomyopathy patients. **Human Immunology**, v. 80, n. 7, p. 517–522, 2019.
- D'AVILA, D. A. et al. Immunological imbalance between IFN-gamma and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 100–105, 2009.
- DE ANDRADE, A. L. et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **Lancet (London, England)**, v. 348, n. 9039, p. 1407–1413, 1996.
- DEWALD, O. et al. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. **Circulation Research**, v. 96, n. 8, p. 881–889, 2005.
- DIAS, J. C. P. et al. 2 nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 49Suppl 1, n. Suppl 1, p. 3–60, 2016a.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Editora FIOCRUZ, 1997. Disponível em: <https://books.scielo.org/id/nf9bn>.

DIAS, J.; SCHOFIELD, C. The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 103–121, 1999.

DINARELLO, C. A. An IL-1 family member requires caspase-1 processing and signals through the ST2 receptor. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 461–462, 2005.

DINARELLO, C. A.; NETEA, M. G. The Interleukin-1 Family. *In*: YOSHIMOTO, T.; YOSHIMOTO, Tomohiro (org.). **Cytokine Frontiers: Regulation of Immune Responses in Health and Disease**. Tokyo: Springer Japan, 2014. p. 3–51.

DOBRICAN-BĂRUȚA, C.-T. et al. The Alarmin Triad-IL-25, IL-33, and TSLP-Serum Levels and Their Clinical Implications in Chronic Spontaneous Urticaria. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 4, p. 2026, 2024.

DUTTA, P. et al. Myocardial infarction activates CCR2+ hematopoietic stem and progenitor cells. **Cell stem cell**, v. 16, n. 5, p. 477–487, 2015.

ECHEVERRIA, L. E.; MORILLO, C. A. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 119–134, 2019.

FABBRO, D. L. et al. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 1–10, 2007.

FAGUNDES, C. T. et al. ST2, an IL-1R family member, attenuates inflammation and lethality after intestinal ischemia and reperfusion. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 2, p. 492–499, 2007.

FRANCO-PAREDES, C. et al. A deadly feast: Elucidating the burden of orally acquired acute Chagas disease in Latin America - Public health and travel medicine importance. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 36, p. 101565, 2020.

GADANI, S. P. et al. The glia-derived alarmin IL-33 orchestrates the immune response and promotes recovery following CNS injury. **Neuron**, v. 85, n. 4, p. 703–709, 2015.

GALLEGO, P. et al. Influence of sex and diet on the gastrointestinal tract in a mice model with partial deficiency for TGF- $\beta$ 3. *In*: , 2020. **Proceedings**. MDPI, 2020. p. 18.

GALVÁN, LOSADA, I. et al. Benznidazole for the treatment of Chagas disease. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 19, n. 5, p. 547–556, 2021.

- GALVAO, L. M. C. et al. Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 2, p. 220–223, 1993.
- GATTA et al. Hypoalbuminemia. **Internal and emergency medicine**, v. 7, p. 193-199, 2012.
- GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nature Reviews. Immunology**, v. 6, n. 12, p. 895–906, 2006.
- GOMES, J. a. S. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1185–1193, 2003.
- GOMES, Y. M.; LORENA, V. M. B.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 115–121, 2009.
- GUO, S. et al. Modulation of Neuroinflammation: Advances in Roles and Mechanisms of the IL-33/ST2 Axis Involved in Ischemic Stroke. **Neuroimmunomodulation**, v. 30, n. 1, p. 226–236, 2023.
- HAYES, M. P. et al. Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. **Blood**, 1995.
- HIDRON, A. et al. Cardiac involvement with parasitic infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 324–349, 2010.
- HIGUCHI, M. D. Endomyocardial biopsy in Chagas' heart disease: pathogenetic contributions. **Revista Paulista De Medicina**, v. 113, n. 2, p. 821–825, 1995.
- HIGUCHI, M. de L. et al. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 423, n. 3, p. 157–160, 1993.
- HOFFMAN, K. A. et al. Improved Biomarker and Imaging Analysis for Characterizing Progressive Cardiac Fibrosis in a Mouse Model of Chronic Chagasic Cardiomyopathy. **Journal of the American Heart Association**, v. 8, n. 22, p. e013365, 2019.
- HÖLSCHER, C. et al. Tumor Necrosis Factor Alpha-Mediated Toxic Shock in *Trypanosoma cruzi* -Infected Interleukin 10-Deficient Mice. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4075–4083, 2000.

HUBER, S. A. et al. Augmentation of pathogenesis of coxsackievirus B3 infections in mice by exogenous administration of interleukin-1 and interleukin-2. **Journal of virology**, v. 68, n. 1, p. 195-206, 1994.

HULSMANS, M.; SAM, F.; NAHRENDORF, M. Monocyte and macrophage contributions to cardiac remodeling. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 93, p. 149–155, 2016.

HUMPHREYS, N. E. et al. IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 180, n. 4, p. 2443–2449, 2008.

HUNTER, C. A. et al. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 7, p. 3311–3316, 1997.

JACKSON, Y. et al. Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 51, n. 10, p. e69-75, 2010.

JACKSON, Y.; WYSSA, B.; CHAPPUIS, F. Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 3, p. 690–696, 2020.

JONES, L. A. et al. IL-33 receptor (T1/ST2) signalling is necessary to prevent the development of encephalitis in mice infected with *Toxoplasma gondii*. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 2, p. 426–436, 2010.

JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 12, p. e29, 2010.

KAMDEM, S. D. et al. Negative Association of Interleukin-33 Plasma Levels and Schistosomiasis Infection in a Site of Polyparasitism in Rural Cameroon. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

KOMAI-KOMA, M. et al. Interleukin-33 promoting Th1 lymphocyte differentiation depends on IL-12. **Immunobiology**, v. 221, n. 3, p. 412–417, 2016.

KROPF, P. et al. Organ-specific distribution of CD4<sup>+</sup> T1/ST2<sup>+</sup> Th2 cells in *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 9, p. 2450–2459, 2002.

KÜCHLER, A. M. et al. Nuclear interleukin-33 is generally expressed in resting endothelium but rapidly lost upon angiogenic or proinflammatory activation. **The American Journal of Pathology**, v. 173, n. 4, p. 1229–1242, 2008.

KUNZELMANN, Karl; MALL, Marcus. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 245-289, 2002.

KUROWSKA-STOLARSKA, M. et al. Interleukin-33: a novel mediator with a role in distinct disease pathologies. **Journal of Internal Medicine**, v. 269, n. 1, p. 29–35, 2011.

LAMBERET, A. et al. IL-33/ST2 axis is involved in disease progression in the spleen during *Leishmania donovani* infection. **Parasites & Vectors**, v. 13, p. 320, 2020.

LEAL-SILVA, T. et al. Detrimental role of IL-33/ST2 pathway sustaining a chronic eosinophil-dependent Th2 inflammatory response, tissue damage and parasite burden during *Toxocara canis* infection in mice. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 7, p. e0009639, 2021.

LEÃO, A. C. et al. Different responses involving Tfh cells delay parasite-specific antibody production in *Trypanosoma cruzi* acute experimental models. **Frontiers in Immunology**, v. 16, p. 1487317, 2025.

LEUSCHNER, F. et al. Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 1, p. 123–137, 2012.

LEVINE, J. H. et al. Data-Driven Phenotypic Dissection of AML Reveals Progenitor-like Cells that Correlate with Prognosis. **Cell**, v. 162, n. 1, p. 184–197, 2015.

LI, Guoqi et al. Optogenetic vagal nerve stimulation attenuates heart failure by limiting the generation of monocyte-derived inflammatory CCRL2<sup>+</sup> macrophages. **Immunity**, 2025.

LIDANI, K. C. F. et al. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. **Frontiers in Public Health**, v. 7, p. 166, 2019.

LIDANI, K. C. F. et al. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 607, 2017.

LIEW, F. Y.; GIRARD, J.-P.; TURNQUIST, H. R. Interleukin-33 in health and disease. **Nature Reviews. Immunology**, v. 16, n. 11, p. 676–689, 2016.

LIEW, F. Y.; PITMAN, N. I.; MCINNES, I. B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. **Nature Reviews. Immunology**, v. 10, n. 2, p. 103–110, 2010.

LIU, G.; ZHAO, Y. Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells. **Immunology**, v. 122, n. 2, p. 149–156, 2007.

MA, Xiaojing. TNF- $\alpha$  and IL-12: a balancing act in macrophage functioning. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 2, p. 121–129, 2001.

MACHADO, F. S. et al. Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. **Frontiers in Bioscience (Elite Edition)**, v. 4, n. 5, p. 1743–1758, 2012.

MACHADO, F. S. et al. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, v. 102, n. 24, p. 3003–3008, 2000.

MAGALHÃES, L. M. D. et al. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. **The Journal of infectious diseases**, v. 207, n. 4, p. 661–665, 2013.

MAGALHÃES, L. M. D. et al. Pathogen diversity, immunity, and the fate of infections: lessons learned from *Trypanosoma cruzi* human-host interactions. **The Lancet. Microbe**, v. 3, n. 9, p. e711–e722, 2022.

MAGGI, L. et al. Role of the IL-33/ST2 Activation Pathway in the Development of the Hepatic Fibrosis Induced by *Schistosoma mansoni* Granulomas in Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 12, p. 10237, 2023.

MAGGI, L. et al. The IL-33/ST2 pathway is not essential to Th2 stimulation but is key for modulation and survival during chronic infection with *Schistosoma mansoni* in mice. **Cytokine**, v. 138, p. 155390, 2021.

MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. The Epidemiology, Clinical Manifestations, and Management of Chagas Heart Disease. **Clinical Cardiology**, v. 38, n. 9, p. 565–569, 2015.

MARIANO, F. S. et al. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 7, p. 825–833, 2008.

MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109–1123, 2007.

MARVIE, P. et al. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 6B, p. 1726–1739, 2010.

MATA-SANTOS, H. A. et al. Heart function enhancement by an Nrf2-activating antioxidant in acute Y-strain Chagas disease, but not in chronic Colombian or Y-strain. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 18, n. 11, p. e0012612, 2024.

MATSUSHITA, K.; YOSHIMOTO, T. Interleukin-33: A Multifunctional Alarmin that Promotes Both Health and Disease. In: YOSHIMOTO, Takayuki; YOSHIMOTO, Tomohiro (org.). **Cytokine Frontiers: Regulation of Immune Responses in Health and Disease**. Tokyo: Springer Japan, 2014. p. 267–299

MCSORLEY, H. J.; SMYTH, D. J. IL-33: A central cytokine in helminth infections. **Seminars in Immunology**, v. 53, p. 101532, 2021.

MEDEIROS, N. I. et al. Evidence of Different IL-1 $\beta$  Activation Pathways in Innate Immune Cells From Indeterminate and Cardiac Patients With Chronic Chagas Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 800, 2019.

MENEGHELLI, U. G. Chagasic enteropathy. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 252–260, 2004.

MESSENGER, L. A.; MILES, M. A.; BERN, C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 13, n. 8, p. 995–1029, 2015.

MILOVANOVIC, M. et al. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. **Immunologic Research**, v. 52, n. 1–2, p. 89–99, 2012.

MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015.

MOUSSION, C.; ORTEGA, N.; GIRARD, J.-P. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel “alarmin”? **PLoS One**, v. 3, n. 10, p. e3331, 2008.

MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A.; FERNÁNDEZ, 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. **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 2, p. 301–307, 1992.

NAGAJYOTHI, F. et al. Alterations in glucose homeostasis in a murine model of Chagas disease. **The American Journal of Pathology**, v. 182, n. 3, p. 886–894, 2013.

NEVES, E. G. A. et al. T-Cell Subpopulations Exhibit Distinct Recruitment Potential, Immunoregulatory Profile and Functional Characteristics in Chagas versus Idiopathic Dilated Cardiomyopathies. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 9, p. 787423, 2022.

NOGUEIRA, D. S. et al. Eosinophils mediate SIgA production triggered by TLR2 and TLR4 to control *Ascaris suum* infection in mice. **PLoS pathogens**, v. 17, n. 11, 2021.

NOGUEIRA, G. et al. Interleukin-17 acts in the hypothalamus reducing food intake. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 87, p. 272–285, 2020.

NOGUEIRA, N. F. S. et al. *Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 2, p. 120–128, 2007.

NUNES, M. C. P. et al. Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circulation**, v. 138, n. 12, p. e169–e209, 2018.

- OHNO, T. et al. Interleukin-33 in allergy. **Allergy**, v. 67, n. 10, p. 1203–1214, 2012.
- OLIVEIRA, D. S. de et al. Insights into IL-33 on inflammatory response during in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. **Immunobiology**, v. 227, n. 4, p. 152243, 2022.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Doença de Chagas. Washington, D.C.: OPAS, 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/doenca-chagas>.
- OPPENHEIM, J. J. et al. Alarmins initiate host defense. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 601, p. 185–194, 2007.
- PALACIOS GIL-ANTUÑANO, S. et al. Mother-to-child Chagas disease transmission: The challenge of detection and prevention in areas without the risk of vectorial transmission. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, v. 164, n. 3, p. 835–842, 2024.
- PASTORELLI, L. et al. The Role of IL-33 in Gut Mucosal Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 608187, 2013.
- PEREIRA, K. S. et al. Chagas' disease as a foodborne illness. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 2, p. 441–446, 2009.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet (London, England)**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018.
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2001.
- QUINTELIER, K. et al., Analyzing high-dimensional cytometry data using FlowSOM. **Nature Protocols**, v. 16, n. 8, p. 3775–3801, 2021.
- RASSI, A. et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 8, p. 799–808, 2006.
- RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 152–158, 2009.
- RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.
- REVERCHON, F. et al. IL-33 receptor ST2 regulates the cognitive impairments associated with experimental cerebral malaria. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 4, p. e1006322, 2017.

ROFFE, E. et al. Increased frequencies of circulating CCR5+ memory T cells are correlated to chronic chagasic cardiomyopathy progression. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 3, p. 641–652, 2019.

ROSTAN, O. et al. The IL-33/ST2 axis is associated with human visceral leishmaniasis and suppresses Th1 responses in the livers of BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. **mBio**, v. 4, n. 5, p. e00383-00313, 2013.

ROTTENBERG, M. E. et al. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 12, p. 5129–5133, 1993.

RYAN, N. et al. The IL-33/ST2 Axis in Immune Responses Against Parasitic Disease: Potential Therapeutic Applications. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020.

RYFFEL, B. et al. Blockade of IL-33R/ST2 signaling attenuates *Toxoplasma gondii* ileitis depending on IL-22 expression. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 702, 2019.

SANADA, S. et al. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 6, p. 1538–1549, 2007.

SÁNCHEZ-VALDÉZ, F. J. et al. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **eLife**, v. 7, p. e34039, 2018.

SANGENITO, L. S. et al. Leishmaniasis and Chagas Disease - Neglected Tropical Diseases: Treatment Updates. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 174–177, 2019.

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

SATHLER-AVELAR, R. et al. Phenotypic and Functional Signatures of Peripheral Blood and Spleen Compartments of Cynomolgus Macaques Infected With *T. cruzi*: Associations With Cardiac Histopathological Characteristics. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 701930, 2021.

SAWADA, H. et al. Expression of interleukin-33 and ST2 in nonrheumatic aortic valve stenosis. **International Journal of Cardiology**, v. 168, n. 1, p. 529–531, 2013.

SCHIJMAN, A. G. et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 1, p. e931, 2011.

SCHMITZ, J. et al. IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 479–490, 2005.

SERRANO, C. J. et al. Cognitive impairment in Chagas disease patients in Brazil, 2007-2021: A cross-sectional study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 19, n. 5, p. e0012981, 2025.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 54, n. 6, p. 845–852, 2012.

SILVA, J. S. et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 1, p. 169–174, 1992.

SILVA, J. S. et al. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 12, p. 4862–4867, 1995.

SINTON, M. et al. IL-17 signalling is critical for controlling subcutaneous adipose tissue dynamics and parasite burden during chronic murine *Trypanosoma brucei* infection. **Nature communications**, v. 14, n. 1, 2023.

SMITHGALL, M. D. et al. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. **International Immunology**, v. 20, n. 8, p. 1019–1030, 2008.

TARLETON, R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 550–554, 2001.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 6, p. 262–265, 2002.

TORRES, R. M. et al. Prognosis of chronic Chagas heart disease and other pending clinical challenges. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e210172, 2022.

VILAR-PEREIRA, G. et al. *Trypanosoma cruzi*-induced depressive-like behavior is independent of meningoencephalitis but responsive to parasiticide and TNF-targeted therapeutic interventions. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 7, p. 1136–1149, 2012.

VIOTTI, R. et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, n. 10, p. 724–734, 2006.

WANG, C.; DONG, C.; XIONG, S. IL-33 enhances macrophage M2 polarization and protects mice from CVB3-induced viral myocarditis. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 103, p. 22–30, 2017.

WHO. **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**. 2024. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 14 out. 2024.

WHO EXPERT COMMITTEE. Control of Chagas disease. **World Health Organization Technical Report Series**, v. 905, p. i–vi, 1–109, back cover, 2002.

YASUDA, K. et al. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 9, p. 3451–3456, 2012.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 240–253, 2012.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, v. 184, p. 38–52, 2018.

ZINGALES, B.; BARTHOLOMEU, D. C. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: impact on transmission cycles and Chagas disease. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e210193, 2022.

## 9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO

### Publicação de artigos:

- MANSUR, ALEXANDRA A. P. ; CARVALHO, SANDHRA M. ; BRITO, RAMAYANA M. DE M. ; CAPANEMA, NÁDIA S. V. ; DUVAL, ISABELA DE B. ; **CARDOZO, MARCELO E.** ; RIHS, JOSÉ B. R. ; LEMOS, GABRIELA G. M. ; LIMA, LETÍCIA C. D. ; REYS, MARINA P. DOS ; RODRIGUES, ANA P. H. ; OLIVEIRA, LUIZ C. A. ; SÁ, MARCOS AUGUSTO DE ; CASSALI, GEOVANNI D. ; BUENO, LILIAN L. ; FUJIWARA, RICARDO T. ; LOBATO, ZELIA I. P. ; MANSUR, HERMAN S. . Arginine-Biofunctionalized Ternary Hydrogel Scaffolds of Carboxymethyl Cellulose-Chitosan-Polyvinyl Alcohol to Deliver Cell Therapy for Wound Healing. **GELS**, v. 10, p. 679, 2024.
- BASTILHO, ALEXANDRE L. ; BRITO, RAMAYANA M.M. ; ANDRADE, JOSÉ L. ; DA ROCHA RIHS, JOSÉ BRYAN ; DE BRITO DUVAL, ISABELA ; **CARDOZO, MARCELO EDUARDO** ; ANTUNES PORTO, ANA RAFAELA ; DO AMARAL, LUISA BRAGA ; NASCIMENTO SOUZA, JORGE LUCAS ; CASSALI, GEOVANNI DANTAS ; MELO, BRENDA K.C. ; LEMOS, JULY ANNE B. ; CAVALCANTE, RÔMULO S. ; BUENO, LILIAN LACERDA ; FUJIWARA, RICARDO TOSHIO ; SOUTO, JANEUSA T. ; MAGALHÃES, LUISA M.D. ; ANDRADE-NETO, VALTER F. *Toxoplasma gondii* non-archetypal strain induces lung inflammation during acute and early chronic infection in mice. **PARASITOLOGY**, p. 1-37, 2025.
- FONSECA, GABRIELA RODRIGUES E ; GROSSI DE OLIVEIRA, ANA LAURA ; BRITO, RAMAYANA MORAIS DE MEDEIROS ; CORRAL, MARCELO ANDRETTA ; WARD, RICHARD JOHN ; DE LIMA, PÂMELA APARECIDA ; RIHS, JOSÉ BRYAN DA ROCHA ; **CARDOZO, MARCELO EDUARDO** ; SATO, PAULA KEIKO ; FUJIWARA, RICARDO TOSHIO ; SANTOS, SERGIO VIEIRA DOS ; GRYSCHER, RONALDO CESAR BORGES ; LESCANO, SUSANA ANGELICA ZEVALLOS . Immunogenic mapping of potential epitopes from Tc-CTL-1 for the diagnosis of murine toxocariasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 120, p. e240111, 2025.
- DE BRITO DUVAL, ISABELA ; **CARDOZO, MARCELO EDUARDO** ; SOUZA, JORGE LUCAS NASCIMENTO ; DE MEDEIROS BRITO, RAMAYANA MORAIS ; FUJIWARA, RICARDO TOSHIO ; BUENO, LILIAN LACERDA ; MAGALHÃES, LUISA MOURÃO DIAS . Parasite infections: how inflammation alters brain function. **TRENDS IN PARASITOLOGY**, v. 41, p. 115-128, 2025.
- PORTO, ANA RAFAELA ANTUNES ; DUVAL, ISABELA DE BRITO ; DO AMARAL, LUISA VITOR BRAGA ; OLIVEIRA, ISABELA DA SILVA ; DE SIQUEIRA, JOÃO GABRIEL ACIOLI ; DE ALBUQUERQUE, BRUNO ARAÚJO ; ROCHA, MARIA ALICE GUARINI ; LEMOS, GABRIELA GOMES MONTEIRO ; **CARDOZO, MARCELO EDUARDO** ; RIHS, JOSÉ BRYAN DA ROCHA ; Fujiwara, Ricardo Toshio ; DE OLIVEIRA, ANA LAURA GROSSI ; BRITO, RAMAYANA MORAIS DE MEDEIROS ; Bueno, Lilian Lacerda . Use of Brazilian flora as the main source of new antimalarials: a systematic review. **Memórias do**

**Instituto Oswaldo Cruz**, v. 120, 2025.