

Universidade Federal de Minas Gerais  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical

PAPEL DE SOCS2 NA RESPOSTA IMUNE E FUNÇÃO  
CARDÍACA DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR  
*Trypanosoma cruzi*

Lísia Maria Esper

Belo Horizonte

2011

Lísia Maria Esper

PAPEL DE SOCS2 NA RESPOSTA IMUNE E FUNÇÃO  
CARDÍACA DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR  
*Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Profa. Dra. Fabiana Simão Machado

Belo Horizonte

2011

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

### **REITOR**

Prof. Clélio Campolina Diniz

### **VICE-REITORA**

Profª. Rocksane de Carvalho Norton

### **PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Ricardo Santiago Gomez

### **PRÓ-REITOR DE PESQUISA**

Prof. Renato de Lima dos Santos

### **DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA**

Prof. Francisco José Penna

### **VICE-DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA**

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

### **COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

### **SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Profª. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

### **CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**

Profª. Anelise Impelziere Nogueira

### **COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.

### **SUB-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

### **COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Denise Utsh Gonçalves

Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior

Antônio Vaz de Macedo (Representante Discente)

*Bendita é a curiosidade que se curva a sabedoria dos povos sofredores*

*“Quando DEUS quer, não tenha quem não queira”*

*(Ayrton Senna)*

*Aos meus pais, José Carmo e Regina: meus maiores exemplos de vida, luta, honestidade, caráter e benevolência. Por me ensinarem a não temer nada e que o amor, o respeito e a lealdade são coisas simples, valiosas e sagradas.*

*Vocês são o que eu tenho de mais valioso. Muito obrigada por tudo.*

*Por vocês, eu tenho o maior amor do mundo.*

*`A minha tia e madrinha Carminha: por ser alegre, determinada, lutadora, ranheta e por “não deixar a peteca cair”....nunca!!!! Eternamente serei grata por tudo!!! Titi, você faz diferença na minha vida. Eu amo você.*

*Ao meu irmão Juninho e a sua bela família....um grande homem de alma tranqüila e com um coração gigantesco.*

*`As minhas sobrinhas e afilhadas Sara Eliza e Samirah, que fazem a vida ter sentido e por tornarem tudo mais belo e feliz. Vocês irradiam felicidade no meu coração minhas flores de girassol.*

## AGRADECIMENTOS

`A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Simão Machado, pela paciência, orientação precisa, competente e admirável com que conduziu este trabalho. Por ter acreditado que eu poderia chegar até aqui e por ter me ensinado a beleza da Ciência com dignidade, clareza e ética. Exemplo de profissionalismo, conhecimento científico, amor e dedicação por essa vida apaixonante em que vivemos. É uma honra muito grande poder fazer parte da sua equipe.

Ao Professor Mauro Martins Teixeira, pela receptividade, carinho e por não medir esforços em nos ajudar. Exemplo de dedicação, conhecimento, liderança e astúcia. Muito obrigada por me abrigar na sua grande família. `A você e a Adla, agradeço.

`A Professora Leda Quércia Vieira e a toda sua equipe (em especial Matheus, Daniel, Waldionê e Grazi) pelo apoio e ajuda constantes desde o início. Obrigada pela acolhida carinhosa e pelo incentivo.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunorregulação de Doenças Infecciosas (LIDIN) sempre tão presentes; Fatinha, Andréia e Ronan, vocês são especiais demais....muito obrigada pela ajuda e apoio constantes desde o início. Pelas risadas e pelos tropeços que passamos juntos; afinal de contas, é assim que se aprende. Cinthya, Bruno, Diego, Tayara e Ricardo por fazerem parte deste grupo incrível.

Aos Professores Antônio Lúcio Teixeira, Manoel Otávio C. Rocha e Herbert B. Tanowitz pelos ensinamentos, incentivos e ajuda. Vocês são fundamentais.

`As Professoras Danielle Souza e Vanessa Pinho e Daniella Bonaventura, pelo carinho, amizade, eficiência, determinação e sabedoria com que conduzem tudo isso. Estendo esses agradecimentos `as suas respectivas famílias (que são minhas também) e aos lindos Pedro, Matheus, Maria Thereza e a um Anjinho que está a caminho..... vocês fazem tudo brilhar, ficar mais bonito e florescer.

Aos Professores Jader S. Cruz, Rosa Arantes, Sérgio Costa, Silvia Guatimosim, e a todos os membros de seus respectivos laboratórios (em especial Danilo, Enéas/Aline ) por estarem sempre dispostos a ajudar com um sorriso estampado no rosto. Muito obrigada.

Ao pequeno grande grupo Imunofar, pela convivência diária que torna tudo mais fácil, divertido e agradável. Especialmente a Frank, Ilma, Naty, Larissa, Marcinha, Davi, Norinne, Milene, Bruno, Aline, Remo, Angélica, Juliana, Bráulio, Bárbara, Cissa, Lú, Ana, Cris, Caio, Flávio, Lucas, Carol, Tiça, Thiago, Mila, Tales, Rê, Raquel, Livinha's (T,R,B), Pedro e Elisão....vocês são incríveis. Fred Batatais, obrigada mesmo meu amigo.

Vívian (Murrrr)...a vida foi muito generosa comigo, pois me presenteou com sua amizade. Muito obrigada!!!

Aos queridíssimos Daniel Cisalpino, Livia Resende e Paty Campi, pela convivência agradabilíssima, pelas rezas e pelas sátiras constantes. Nós formamos um Quarteto Lipoxinético Fantástico.

Aos queridos Benedito Machado, Jovitinha e Flavinha (minha outra família) por me ensinarem muitas coisas ao longo da vida. Por chorarem a minha dor e compartilharem as minhas alegrias. Exemplos de dignidade, caráter e bondade. Vocês são tudo e algo mais de especial nessa vida. Sou e serei grata por tudo...para sempre.

`A minha família em geral, em especial as minhas tias Odete, Vânia, Maria Inês e Neusa pela torcida e pelas rezas e aos meus primos que torcem por mim.

`As minhas irmãs mais do que queridas Sônia (Ninha, Vivaldo e Lara) e comadre Solange (Márcio, Fellipe e Gabriel) que me conhecem tão bem e compreendem tudo, sem dizer uma única palavra. Pelo apoio, amor, carinho e por estarem comigo desde sempre. Se DEUS me der mil vidas, mil vezes quero caminhar com vocês.

Aos queridos amigos de longa data, André Pitondo, Emerson, Iratxe Abarrategui, Jane, Xuxa, Josi e Cris (Tisê) por torcerem por mim, mesmo estando muito longe!!!! Saudades de vocês queridos amigos.

`As secretárias administrativas Jussara Magalhães, Andréia Nilles e Mirla Braga, pela ajuda sempre acompanhada de boa vontade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo `a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e PRPq- UFMG pelo apoio financeiro.



## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

**“A amizade é um amor que nunca morre”**

***(Mário Quintana)***

Fabiana Simão Machado (Fabi's), querida e grande amiga que me ensinou desde os primórdios da humanidade que “ninguém muda a vida de ninguém por ninguém”.

Essa verdade eu guardo e levo comigo.

Pelas risadas, pelo carinho, pela compreensão, pela alegria, pelos conselhos, pelas festas, pelo ombro amigo, pelos puxões de orelha, por toda ajuda ao longo de todos esses anos e pela sabedoria que possui na arte de conviver.

A você, não só agradeço, como dedico este trabalho.

Meus eternos e sinceros agradecimentos.

(We did it, we did it, we did it!!!!)

“ Afinal de contas, não tem nada mais importante na vida do que Ovo e Chorumelos.”

## RESUMO

A infecção com *Trypanosoma cruzi* resulta em uma reação inflamatória a qual limita a proliferação do parasita podendo causar cardiomiopatia Chagásica. A via da enzima 5-Lipoxigenase induz a expressão de SOCS2 (*Supressor de Sinalização de Citocinas*) que é um importante regulador da resposta imune. No presente trabalho, nós pesquisamos o papel de SOCS2 na patogênese da infecção pelo *T. cruzi*. Nós investigamos a expressão de SOCS2 em camundongos wild type (WT), 5-LO knockout (KO) e SOCS2 KO durante a infecção e seus efeitos no desenvolvimento da resposta imune e na fisiopatologia cardíaca. Nossos resultados mostraram uma redução da parasitemia e expressão de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, SOCS1 e SOCS3 no baço e IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , SOCS1 e SOCS3 no coração de animais SOCS2 KO. Adicionalmente, houve um aumento da expressão de Lipoxina A<sub>4</sub> e da geração/expansão de células T regulatórias e uma diminuição de células de memória em camundongos SOCS2 KO infectados com *T. cruzi*. Análises eletrofisiológicas e de ecocardiograma mostraram um dano na função cardíaca de animais SOCS2 KO infectados, o qual se deve em parte, a uma falha no controle de cálcio, nas mudanças do potencial de ação e de uma redução da corrente de potássio de cardiomiócitos isolados.

A deficiência de SOCS2 resulta em uma resposta inflamatória reduzida e um melhor controle da infecção, o que é secundário a um aumento de Lipoxina A<sub>4</sub> e indução de células T regulatórias. Isso ocorre a custo de uma maior disfunção cardíaca associada a infecção, salientando a importância do balanço das respostas imune e inflamatória na prevenção de doença grave no contexto da infecção com *Trypanosoma cruzi*.

## ABSTRACT

Infection with *Trypanosoma cruzi* induces robust inflammation that limits parasite proliferation but may result in Chagas heart disease. The 5-Lipoxygenase pathway induces suppressor of cytokine signaling(SOCS)2 expression, an important regulator of immune responses. Here, we investigated the role of SOCS2 for the pathogenesis of *T. cruzi* infection.

We investigated the expression of SOCS2 in wild type, 5-LO knockout-(KO) and SOCS2-KO mice during infection and its effects on the development of the immune response and cardiac pathology. There was reduction of parasitemia and expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, SOCS1 and SOCS3 in the spleen and IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , SOCS1 and SOCS3 in the heart of infected SOCS2-KO mice. Additionally, there was an increase Lipoxina A<sub>4</sub> and generation/expansion of T regulatory and a decrease of memory cells in *T. cruzi*-infected SOCS2KO. Electrophysiological/echocardiographic analyses showed an impairment of cardiac function in *T. cruzi*-infected SOCS2-KO mice, which was due in part to a disturbance of calcium handling, changes in action potential waveform and reduced outward potassium current in isolated cardiomyocytes.

SOCS2 deficiency results in reduced inflammatory response and better control of infection, which is secondary to increased LXA<sub>4</sub> and Treg cells induction. This occurs at the cost of greater infection-associated heart dysfunction, highlighting the relevance of balanced inflammatory and immune responses in preventing severe disease in the context of *T. cruzi* infection.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA - Ácido aracdônico (*Arachidonic acid*)
- AhR - Receptor Aril Hidrocarbono (*Aryl hydrocarbon receptor*)
- BSA - Soralbumina bovina (*Bovine Serum Albumine*)
- Ca<sup>2+</sup> - Cálcio
- CaCl<sub>2</sub> - Cloreto de Cálcio
- CEBIO - Centro de Bioterismo
- CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal
- CO<sub>2</sub> - Gás carbônico
- CsCl - Cloreto de césio
- CsOH - Hidróxido de césio
- DNA - Ácido desoxirribonucléico (*Deoxyribonucleic acid*)
- DP - Desvio padrão
- dpi - Dias pós-infecção (*days post-infection*)
- EDTA - Ácido etil-diamino-tetra-acético
- ERK - Cinase regulada por sinal extracelular
- EGF - Fator de crescimento epidermal
- EGTA - Ácido etileno-glicol tetraédrico
- E<sub>i</sub> - Potencial de equilíbrio eletroquímico para íon
- ELISA - Ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)
- EPO - Eritropoietina
- F - Fluorescência máxima
- F<sub>0</sub> - Fluorescência basal
- F/F<sub>0</sub> - Razão entre as fluorescências
- FAC - Fração de Circunferência da área (*Fraction of circumferential area*)
- FBS - Soro bovino fetal
- G<sub>max</sub> - Máxima condutância
- HBSS - Solução salina balanceada de Hanks'
- HE - coloração Hematoxilina-Eosina
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Ácido sulfúrico
- I<sub>Ca,L</sub> - Corrente de cálcio do tipo L
- I<sub>Na</sub> - Corrente de Sódio

ICB - Instituto de Ciências Biológicas  
IFN- $\gamma$  - Interferon gamma  
IGF - Fator de crescimento similar `a insulina  
IL-1 $\beta$  - Interleucina 1  
IL-2 - Interleucina 2  
IL-3 - Interleucina 3  
IL-6 - Interleucina 6  
IL-10 - Interleucina 10  
IL-12 - Interleucina 12  
i.p. - Intraperitoneal  
I<sub>o</sub> - Corrente de Potássio transitória de saída  
KCl - Cloreto de Potássio  
kHz - Kilohertz (Unidade de corrente alternativa)  
KO - knockout  
KOH - Hidróxido de potássio  
LIF - Fator inibidor de leucemia  
LLC-MK2 - Células epiteliais de rim de macaco (*Monkey kidney epithelial cell line*)  
LT - Leucotrieno  
LTB<sub>4</sub> - Leucotrieno B<sub>4</sub> (*Leukotriene B<sub>4</sub>*)  
LV mass - Massa do ventrículo esquerdo  
LV area - Área do ventrículo esquerdo  
LXA<sub>4</sub> - Lipoxina A<sub>4</sub>  
mg - Miligrama  
 $\mu$ g - Micrograma  
 $\mu$ m - Micrômetro  
MEK5 - Proteína cinase ativadora de mitógeno  
MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de Magnésio  
 $\mu$ L - Microlitro  
mL - Mililitro  
mM - Millimolar  
 $\mu$ M - Micromoles  
NaCl - Cloreto de Sódio  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Fosfato monobásico de sódio

NaNO<sub>2</sub> - Nitrito de sódio  
ng - Nanograma  
NK - Células matadoras naturais (*Natural killer*)  
NO - Óxido nítrico  
PBS - Tampão fosfato de sódio (*Phosphate buffered saline*)  
RNA - Ácido ribonucleico  
r.p.m. - Rotações por minuto  
RPMI - Meio de cultura (*Roswell Park Memorial Institute 1640 medium*)  
Rs - Resistência de série (*series resistance*)  
RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase  
RV área - Área do ventrículo direito  
SOCS1 - (*Supressor de sinalização de citocina*) 1  
SOCS2 - (*Supressor de sinalização de citocina*) 2  
SOCS3 - (*Supressor de sinalização de citocina*) 3  
Tc - *Trypanosoma cruzi*  
T cells - Células T  
TGF- $\beta$  - Fator de transformação de crescimento (*Transforming growth factor*)  
Th1 - Linfócito T *helper* tipo 1  
Th2 - Linfócito T *helper* tipo 2  
Time (ms) - Tempo de resposta em milisegundos  
TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa  
TRAF - Fator associado ao receptor de TNF  
Treg - Células T regulatórias  
Tris-HCl - Tris hidrocloreto  
 $v_m$  (mV) - Potencial de membrana  
WT - Wild type (*animal selvagem WT*)  
Y strain - cepa Y  
5-LO - 5-Lipoxigenase

## SUMÁRIO

1 - Introdução.....	02
2 - Justificativa e Objetivo Geral.....	18
3 - Materiais e Métodos.....	20
4 - Resultados.....	31
5 - Discussão.....	48
6 - Conclusões.....	55
7 - Referências.....	57

# ***Introdução***



Em abril de 1909, o médico mineiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, examinando o sangue de uma criança febril de dois anos chamada Berenice, (que seria então considerada o primeiro caso da doença que levaria o nome do pesquisador- a doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana) encontrou o parasita flagelado o qual propôs o nome de *Trypanosoma cruzi* em homenagem ao seu amigo e mentor Oswaldo Cruz. Este feito foi considerado único na história da medicina em que o mesmo pesquisador, em um curto espaço de tempo, identificava o vetor, o parasito e uma nova doença humana. Neste mesmo ano, foi publicado o primeiro trabalho sobre a nova entidade mórbida por ele descrita (Chagas, 1909). O agente etiológico da doença Chagas ou Tripanossomíase Americana, *Trypanosoma cruzi*, é um parasita hemoflagelado pertencente a ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae, gênero *Trypanosoma* (Hoare & Wallace, 1966) que infecta animais mamíferos incluindo humanos (Chagas, 1916). Mesmo após 102 anos de sua descoberta, a doença de Chagas ainda é uma das causas de doenças cardíacas e gastrointestinais em áreas endêmicas do México, América Central e do Sul, onde afeta cerca de 7.8 milhões de pessoas e mais de 28 milhões vivem em áreas de risco (Maya *et al.*, 2010). O ciclo biológico do *T. cruzi* é complexo e envolve um hospedeiro vertebrado mamífero e um vetor intermediário invertebrado (hematófagos da sub-família *Triatominae*). No hospedeiro vertebrado, este parasita encontra-se em duas formas: tripomastigota (encontrada na circulação), que é a forma sanguínea infectante de células nucleadas (incluindo células dendríticas, musculares, nervosas, macrófagos e fibroblastos), flageladas, móveis e não replicativas e a forma amastigota (encontrada nos tecidos), que se replica no citosol da célula do hospedeiro (Mayer, 1914), sendo necessário a invasão e a replicação celular para a conservação do ciclo de vida do parasita e indução da doença. No triatomíneo (insetos da família *Reduviidae*) é possível encontrar no tubo digestivo as formas epimastigotas replicativas e tripomastigotas metacíclicas, sendo ambas flageladas

(Brenner, 1973). A infecção natural do hospedeiro mamífero ocorre quando formas tripomastigotas metacíclicas (infectantes), eliminadas nas fezes do inseto vetor penetram na pele lesada ou mucosas (Hoare, 1966). Ao penetrar nas células, as formas tripomastigotas escapam do fagolisossomo e sofrem, no citoplasma, diferenciação celular para as formas amastigotas. Em aproximadamente cinco dias, tais formas se transformam em tripomastigotas e iniciam um intenso movimento que contribui para a ruptura da célula hospedeira levando a liberação dos parasitos e infecção de novas células (Hoare & Wallace, 1966). Durante essa fase, novos triatomíneos vetores também podem ser infectados ao fazerem o repasto sanguíneo. Os mecanismos de invasão das células do hospedeiro ainda não estão totalmente esclarecidos; no entanto, existem fases distintas como adesão (envolvendo uma série de moléculas tanto do parasita quanto das células a serem infectadas) (Ruiz *et al.*, 1993), interiorização (dependente do parasita, da célula a ser infectada ou ambos) (Chambo *et al.*, 1990; Dvorak & Schmunis, 1972; Maria, Alcântara & Brenner, 1982; Tardieux *et al.*, 1992) e saída do parasita do vacúolo parasitóforo para o citoplasma da célula hospedeira (Andrews *et al.*, 1990; Ley *et al.*, 1990).

Um intenso controle da transmissão da doença de Chagas têm ocorrido nos últimos 20 anos através de estratégias de eliminação do vetor e melhora na segurança das transfusões sanguíneas em áreas endêmicas. O resultado foi que a incidência da doença diminuiu, na América Latina, de 700.000 novos casos por ano para 40.000, e o número de mortes anuais caíram de mais de 45.000 para 12.500 (Moncayo & Silveira, 2009). Entretanto, a doença de Chagas continua sendo um importante problema de saúde pública mesmo em países não endêmicos pois, atualmente, a migração legal ou ilegal para esses países têm sido a principal causa de transmissão da doença. Na ausência do vetor, imigrantes infectados oferecem risco de infecção por transfusões de sangue ou congênita (Coura & Borges-Pereira, 2010). Em áreas endêmicas, o papel da via oral na transmissão

não é uma idéia recente. O primeiro caso desse tipo de contaminação foi documentado em 1965 (Da Silva *et al.*, 1968), na qual a infecção oral ocorre após a ingestão de alimentos, principalmente cana-de-açúcar e açaí, contaminados com o triatomíneo ou com suas fezes. O curso da infecção nos vertebrados susceptíveis é extremamente variável, sendo influenciado por algumas características como a cepa do parasita, fatores ambientais, nutricionais, metabólicos e genéticos do hospedeiro.

A infecção inicial é seguida por um período pré-patente, de tempo variável, e devido a multiplicação exponencial dos parasitas, surge uma fase aguda caracterizada por evidente parasitemia observada no exame direto do sangue (Coura, 2007). Essa fase possui uma duração de 1 a 3 meses e, na maioria dos casos, é assintomática em adultos não sendo valorizada pelo paciente. Porém, em crianças, podem aparecer sintomas como febre, mal-estar, vômitos e adenomegalia (Rassi, 1979). Em um número menor de casos, há o desenvolvimento de problemas mais graves como miocardite aguda acompanhada de cardiomegalia ou meningoencefalite, podendo muitas vezes ser fatal (Moncayo & Ortiz Yanine, 2006). Em casos de transmissão vetorial, é possível observar o sinal de porta de entrada do *T. cruzi* através da pele (chagoma de inoculação) ou próximo a mucosa ocular, que se manifesta como uma reação da conjuntiva com edema das pálpebras de um lado da face (sinal de Romaña) (Moncayo & Ortiz Yanine, 2006; Rassi Jr., Rassi & Little, 2000). Entretanto, na maioria dos indivíduos afetados, todas as manifestações clínicas da fase aguda desaparecem de 4-8 semanas após o início da infecção (Moncayo & Ortiz Yanine, 2006).

A fase crônica da doença se inicia quando as manifestações clínicas da fase aguda desaparecem. Nesta fase, a doença pode ser, na grande maioria dos casos, assintomática, caracterizando sua forma indeterminada (60-70%), por ausência de sinais clínicos e parasitemia muito baixa, podendo ser evidenciada somente por hemoculturas,

xenodiagnósticos ou PCR (Moncayo & Ortiz Yanine, 2006) ou apresentar sintomas como complicações cardíacas (20-30%) e/ou digestivas (10-15%) (Rassi Jr., Rassi & Little, 2000). As manifestações da fase crônica sintomática aparecem 10 anos ou mais após a infecção inicial, sendo que o coração e o trato digestivo são os órgãos mais comprometidos durante esta fase. A cardiomiopatia Chagásica crônica é a manifestação mais importante da doença de Chagas em humanos, afetando cerca de 20-30% dos indivíduos nesta fase da infecção causando arritmias, tromboelismo, insuficiência cardíaca e morte súbita (Rocha *et al.*, 2007). A forma digestiva da doença envolve aperistalsia e dilatação do esôfago e intestino (megaesôfago e megacólon); tanto a forma cardíaca quanto a forma digestiva foram inicialmente associadas com a destruição do sistema nervoso autônomo que inerva os órgãos afetados (Koberle, 1968; 1974; 1957). Alguns pesquisadores relataram que a reação inflamatória principalmente no miocárdio era desproporcional ao parasitismo tecidual, o qual o infiltrado inflamatório parecia ser mais lesivo para as fibras cardíacas do que para os próprios parasitas (Viana, 1911; Mayer, 1914; Chagas, 1916). Apesar de algumas controvérsias sobre os mecanismos que desencadeiam a resposta inflamatória no coração, é certo que a reação inflamatória é dependente de linfócitos T sensibilizados, uma vez que camundongos atímicos infectados com *T. cruzi*, a despeito de um intenso parasitismo tecidual, não exibem resposta no miocárdio. Com isso, sugere-se que mesmo a cardite da fase aguda seja totalmente dependente de linfócitos T sensibilizados contra antígenos do *T. cruzi* (Ribeiro-dos-Santos & Rossi, 1985).

Quanto a miocardite chagásica crônica, esta caracteriza-se por um infiltrado de células mononucleares, destruição de fibras miocárdicas no foco inflamatório, presença de áreas de fibrose e raros parasitas nas lesões. Essas características morfológicas têm levado inúmeros pesquisadores a qualificarem as lesões de cardiopatia chagásica crônica como dependentes de agressão mediados por fenômenos “imuno-alérgicos”, cuja patogenia ainda

não é totalmente clara. Magarinos Torres (Magarino Torres, 1929) e Chagas (Chagas, 1934) admitiram os fenômenos de hipersensibilidade ou respostas hiperérgicas para explicar o fato de o substrato inflamatório do miocárdio não ser acompanhado do parasita, o que determinaria mais tarde, o aparecimento de reação inflamatória no coração (Andrade & Andrade, 1968; Magarino Torres & Tavares, 1953). Higuchi e colaboradores demonstraram que a maioria das células presentes no infiltrado inflamatório de pacientes com formas cardíacas é do tipo célula T CD8<sup>+</sup>, com reduzido número de células T CD4<sup>+</sup> (Higuchi *et al.*, 1993). Dados semelhantes demonstraram que na miocardite chagásica crônica parte do exsudato é constituído por células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, sendo as últimas mais numerosas. Entretanto, como algumas pessoas não desenvolvem a doença cardíaca, o mecanismo pelo qual o parasitismo causa o dano tecidual na fase crônica da doença ainda não é completamente entendido (Marin-Neto *et al.*, 2007).

Atualmente existem várias correntes de ideias para explicar o aparecimento de cardiomiopatia em pacientes ou animais infectados com *Trypanosoma cruzi*: 1) resposta imune contra autoantígenos, acarretando em uma possível doença autoimune, 2) substâncias cardiotoxícas ou neurotóxicas produzidas pelos parasitas, 3) cardiopatia como consequência de uma neuropatia autonômica, 4) parasitas como indutores da formação de microtrombos desencadeando o comprometimento da microvasculatura coronária, miocitólise e inflamação crônica, 5) antígenos parasitários que persistem no coração seriam alvos de linfócitos T ou de anticorpos levando a uma inflamação cardíaca e 6) o desequilíbrio entre mecanismos oxidantes/antioxidantes (como óxido nítrico e a enzima superóxido dismutase) e citocinas pró/anti-inflamatórias (TNF e IL-10), assim como a persistência de determinadas sub-populações de células TDC8<sup>+</sup> no tecido cardíaco, poderiam influenciar a gravidade das lesões desenvolvidas pelo indivíduo infectado, que seriam consequência de uma relação duradoura e complexa entre o parasita e a resposta imune mal regulada dos indivíduos

infectados que desenvolvem as formas graves da doença de Chagas. Desta maneira, é possível que a cardiopatia chagásica seja o resultado de uma somatória de eventos patogênicos contribuindo em maior ou menor extensão, dependendo do tempo de infecção, cepa do parasita infectante, condições ambientais, metabólicas, genética e idade do hospedeiro, entre outras.

A natureza da imunidade protetora adquirida contra a infecção pelo *T. cruzi* e os mecanismos pelos quais o parasita evade a resposta imune do hospedeiro não foram ainda totalmente esclarecidos, embora evidências mostrem a participação das respostas celular e humoral nesse processo.

Animais vertebrados de sangue frio, anfíbios e répteis são inacessíveis a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (Dias, 1934; Rubio, 1956); quando esses animais são inoculados, eles podem apresentar o parasita na circulação e no ponto de inoculação durante algumas poucas horas, porém, não exibem parasitismo celular e não apresentam multiplicação dos parasitas nas células, cujo mecanismo de defesa pode ser explicado pela existência de uma fagocitose eficiente combinada com lise das formas inoculadas (Dias, 1934; Rubio, 1956); as aves também possuem uma resistência natural a essa infecção, o que foi atribuído a temperatura corpórea e aos anticorpos naturais contra o parasita (Rubio, 1956; Warren & Borsos, 1959). Concluiu-se então que a destruição dos parasitas era consequência da ativação da via alternativa do sistema complemento, uma vez que soro de aves com agamaglobulinemia se mostraram líticas para formas tripomastigotas e epimastigotas dos parasitas isolados do sangue de camundongos infectados e que a capacidade de lise destes soros, são dependentes de magnésio e independentes de cálcio (Kierszenbaum, Ivanyi & Budzko, 1976).

Soros de humanos normais, cobaias, ratos, carneiros e hamster possuem efeito lítico apenas sobre as formas epimastigotas (Muniz & Borriello, 1945; Rubio, 1956); as formas

tripomastigotas são lisadas apenas na presença de anticorpos líticos específicos (Lima-Martins, Sanchez, Krettli & Brener, 1985). O curso da infecção foi demonstrado poder ser influenciado pela temperatura ambiente, o qual camundongos infectados com *T. cruzi* e mantidos em temperaturas entre 35 e 37°C apresentaram redução da parasitemia e do número de parasitas intracelulares quando comparados com animais mantidos entre 10 e 18°C (Kolodny, 1940).

Um aspecto fundamental na imunidade contra a infecção pelo *T. cruzi* refere-se a indução e produção de citocinas por macrófagos ou células mononucleares que, quando produzidas logo após a infecção, podem induzir ou inibir a ativação celular e influenciar nas respostas imunes específicas.

Blanchard em 1912 demonstrou que animais que sobreviveram a infecção pelo *T. cruzi* adquiriram imunidade e se tornaram resistentes a infecções (Blanchard, 1912); estudos posteriores confirmaram esse estudo (Dias, 1934; Hauschka *et al.*, 1950; Norman, 1960; Pizzi, 1952); A partir de então, a possibilidade de imunização ativa contra esta doença passou a ser o principal foco de estudos de vários pesquisadores. Porém, a reativação da parasitemia e aumento da mortalidade da doença pode ocorrer por exemplo em indivíduos infectados pelo vírus HIV que usam drogas imunossupressoras (Rocha *et al.*, 1994). Embora ocorra uma resposta imune contra o parasita, esta não leva a cura; humanos infectados, quando não tratados, apresentam o parasita circulante (em baixos níveis) por toda a vida. Dessa maneira, a resposta imune mantém um equilíbrio na relação parasito-hospedeiro durante toda a vida do indivíduo.

Considera-se que a resposta imune contra a infecção pelo *T. cruzi* seja complexa e que diferentes tipos de respostas ocorram em compartimentos distintos do sistema imune, como a indução da proliferação de células B. A ativação policlonal de células B é uma característica de inúmeras infecções, o qual uma forte indução policlonal dessas células

resulta em gamma-hiperglobulinemia, que pode ser crucial para uma defesa inicial do hospedeiro em resposta a um microrganismo devido a presença de anticorpos específicos presentes em estruturas conservadas nos patógenos. Embora proteínas dos parasita sejam capazes de induzir a expansão de células B, sua contribuição na resistência do hospedeiro ainda continua sendo motivo de discussão (de Meis *et al.*, 2009). Camundongos deficientes de células B possuem uma alta mortalidade na infecção tardia, com uma deficiência em eliminar formas tripomastigotas da circulação. Por outro lado, a ativação policlonal de células B contribuem nas alterações patológicas observadas na doença de Chagas (de Meis *et al.*, 2009). Existem muitas controvérsias quanto ao papel dos anticorpos em conferir resistência a infecção pelo *T. cruzi*. Uma delas, quanto ao papel dos anticorpos em transferir imunidade, podem ser explicadas pela imensa variedade de protocolos experimentais utilizados; em experimentos bem controlados, observou-se claramente que nem todas as classes de anticorpos são efetivas em transferir imunidade. IgM e IgG1 são ineficazes, enquanto IgG2a e IgG2b, obtidas na fase crônica da infecção são capazes de tornar os animais receptores mais resistentes, conferindo menor parasitemia e mortalidade (Scott & Goss-Sampson, 1984; Takehara, Brodskyn & Mota, 1989; Takehara, Perini & Mota, 1981). Soma-se que anticorpos devem participar com linfócitos T, macrófagos e citocinas no sentido de, em conjunto, promoverem resistência ao hospedeiro.

Uma resposta imune rápida e eficaz contra patógenos (ex: *T. cruzi*, *T. gondii*, *M. tuberculosis* entre outros) é essencial para o estabelecimento do balanço da relação patógeno/hospedeiro, que permite a sobrevivência de ambos `a fase inicial da infecção e progressão para a infecção latente. Os linfócitos T são as principais células na imunidade celular o qual tornam-se sensibilizados durante a infecção; quando estimulados com antígenos apropriados, secretam uma variedade de citocinas que, por sua vez, irão modular as respostas imune e inflamatória e conseqüentemente migração celular para o local do



estímulo antigênico. Hipersensibilidade do tipo tardia, ensaios de inibição da migração de macrófagos e resposta blastogênica são normalmente positivos em humanos e animais infectados com *T. cruzi*, deixando clara a participação da imunidade celular contra o parasita.

Infectando-se animais com timectomia neonatal (Schmunis *et al.*, 1971) ou geneticamente desprovidos de timo (Kierszenbaum & Pienkowski, 1979), estes apresentaram uma intensa parasitemia e 100% de mortalidade quando comparados aos controles que sobreviveram a infecção, concluindo-se então, que a imunidade mediada por células desempenha um importante papel protetor em camundongos infectados com *T. cruzi*.

Quando se estudou o papel das subpopulações de linfócitos T, concluiu-se que ambas as populações, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, participam como mediadores da proteção em camundongos infectados. Quando essas populações foram depletadas antes ou logo após a infecção, verificou-se que os animais ficaram mais susceptíveis a infecção (Araújo, 1989; Russo *et al.*, 1988; Tarleton, 1990). Portanto, o controle da infecção por *T. cruzi* é dependente de uma somatória de efeitos no qual participam anticorpos, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, granulócitos e plaquetas.

A resposta imune protetora e o tipo de célula T auxiliar a ser expandido são influenciados pela presença de citocinas durante o processo de diferenciação celular. Citocinas como IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-4 podem reger a diferenciação de subpopulações de células T com ativação de Th1 ou Th2, que foram definidas com base em seu padrão de secreção de citocinas (Mosmann *et al.*, 1986; Mosmann & Sad, 1996).

Entre as citocinas produzidas, IFN- $\gamma$  é uma citocina pró-inflamatória essencial no controle da replicação do patógeno. Em uma resposta imune inata ausente, o controle inicial da replicação do parasita dependente de IFN- $\gamma$  é comprometida. IL-12 é uma citocina ativadora de células Natural Killer (NK), essencial para indução de resposta imune

dependente de IFN- $\gamma$  contra *T. cruzi* em ambas as repostas imunes, inata e adaptativa (Aliberti *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1995; Torrico *et al.*, 1991). IL-12 além de ativar células NK a produzirem IFN- $\gamma$ , direcionam a proliferação de células Th1 (TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>), as quais produzem mais IFN- $\gamma$  que, por sua vez, ativa macrófagos infectados com *T. cruzi* a produzirem óxido nítrico (NO) que é responsável pelo controle do crescimento do parasita intracelular (Torrico *et al.*, 1991). Animais deficientes de IL-12p40 são extremamente susceptíveis a infecção por *T. cruzi* (Aliberti *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1995).

A produção de IFN- $\gamma$  também está envolvida na indução da produção de TNF (Fator de necrose tumoral) e IL-1 $\beta$  por macrófagos. TNF é uma citocina envolvida em inflamações sistêmicas sendo membro de um grupo de citocinas que estimulam reações na fase aguda; sua produção ocorre principalmente por macrófagos ativados e outros tipos celulares como células endoteliais, cardiomiócitos, tecido adiposo e fibroblastos. O papel primário desta citocina envolve a regulação de células do sistema imune.

Cardiomiócitos e macrófagos peritoneais produzem TNF em quantidades significativas *in vitro* quando na presença de *T. cruzi* e IFN- $\gamma$ , e atua de maneira autócrina sobre macrófagos e miócitos cardíacos infectados, desempenhando um papel fundamental no controle da replicação intracelular dos parasitas e na modulação da produção de quimiocinas por estas células (Machado *et al.*, 2000).

Por outro lado, as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$  inibem a ativação de macrófagos mediada por IFN- $\gamma$  inibindo a produção de NO, quimiocinas e células produtoras de IFN- $\gamma$ . A neutralização de IL-10 endógena aumenta a produção de IFN- $\gamma$  induzido por *T. cruzi* e morte do parasita (Silva *et al.*, 2003; Cardillo *et al.*, 1996). Esses estudos coletivamente sugerem que IL-12 e IFN- $\gamma$  favorecem a diferenciação de linfócitos Th1, levando a produção de IFN- $\gamma$  e diminuição da síntese de IL-10, sendo um mecanismo

chave requerido para a indução e manutenção do controle da infecção aguda por *T. cruzi* (Silva *et al.*, 1992, 1995; Torrico *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 2003; Cardillo *et al.*, 1996; Reed *et al.*, 1994). A resistência primária a infecção é um resultado do balanço entre a produção de citocinas pró (IFN- $\gamma$ ) e antiinflamatórias (IL-10) (Cardillo *et al.*, 1996).

A patogênese na doença de Chagas não é completamente entendida, uma vez que alguns indivíduos infectados nunca desenvolvem a doença (Marin-Neto *et al.*, 2007; Gutierrez *et al.*, 2009). A resposta imune gerada contra a infecção pelo *T. cruzi* é efetiva em controlar, mas não em eliminar a infecção.

Têm sido mostrado que a liberação de eicosanoides durante a infecção com *T. cruzi* regula a resposta imune do hospedeiro e controla a progressão da doença (Ashton *et al.*, 2007). A sobrevivência do hospedeiro durante a infecção não depende somente do balanço da produção de citocinas, mas também de mediadores lipídicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA) (Borges *et al.*, 2009; Hideko *et al.*, 2008).

Os eicosanoides ou eicosanoides (do Grego *eikosi* para “vinte”) são uma classe de mediadores lipídicos de grande importância que atuam tanto na manutenção da homeostase fisiológica, quanto em condições patológicas, sendo extremamente abrangentes e relevantes em quase todos os sistemas e tecidos dos mamíferos (Brock & Peters-Golden, 2007); São liberados por diversos tipos celulares e agem nas células alvo, sendo os receptores acoplados a proteína G (GPCRs) seus receptores típicos (Drachman & Rothstein, 2000). Originalmente os eicosanoides foram reconhecidos por sua capacidade de causar respostas biológicas como a contração da musculatura lisa, edema e agregação plaquetária; recentemente possui outras funções como participantes em diversos processos biológicos como na inflamação e na resposta imune sob diversas condições (Brock & Peters-Golden, 2007).

Enquanto alguns mediadores lipídicos controlam a inflamação aguda, outros mediadores endógenos controlam os eventos pró-inflamatórios. Como exemplo claro, é a modulação da atividade da 5-Lipoxigenase (5-LO).

A enzima 5-LO pertence a uma família de enzimas (lipoxigenases) que contém ferro não associado a um grupo heme e que catalisam a oxidação de ácidos graxos poliênicos para hidroperóxidos de lipídeos (Shimizu, 2009). O ácido araquidônico é metabolizado para ácidos hidroperoxi-eicosatetraenoicos (HPETE), que variam quanto ao sítio de inserção do grupo hidroperóxido (Ferguson *et al.*, 2007; Shimizu, 2009). Quando populações celulares como eosinófilos, mastócitos, leucócitos polimorfonucleares e/ou monócitos são ativados, a enzima 5-LO é translocada para a membrana nuclear, onde se associa com uma proteína conhecida como sendo ativadora de 5-LO (FLAP), onde transforma o ácido araquidônico em 5-HPETE, transformando-o em leucotrieno A4 (LTA4) que, pela ação da enzima LTA4 hidrolase, transformando-o em leucotrieno B4 (LTB4) e também em outros leucotrienos que possuem papéis fundamentais nos sistemas respiratórios e cardiovasculares (Ferguson *et al.*, 2007; Shimizu, 2009).

Os leucotrienos são mediadores lipídicos ecosanoides com importante envolvimento nos processos inflamatórios, sendo moléculas fundamentais nos processos de manutenção da homeostasia vascular e respiratória e também da inflamação (Yokomizo *et al.*, 2000; Shimizu, 2009). Os leucotrienos possuem papéis fisiológicos na imunidade inata e patológicos nas doenças inflamatórias (Ferguson *et al.*, 2007). Seu papel na patogênese da infecção por *T. cruzi* foi descrito atualmente. Na deficiência de 5-LO, ocorre redução da miocardite, protegendo os animais durante a infecção com *T. cruzi* (Pavanelli *et al.*, 2010); atua também no recrutamento de células inflamatórias (Tager *et al.*, 2003; Tager & Luster, 2003) e na regulação da produção do óxido nítrico (Gorelik *et al.*, 1992; Talvani *et al.*, 2002). LTB4 é um potente quimioatraente e regulador das respostas imunes, sendo

que em elevadas concentrações estimula a agregação de neutrófilos e promove nestas células a degranulação e geração de superóxido. Em neutrófilos, promove sua adesão a células do endotélio vascular e transmigração. A biosíntese de leucotrienos é restrita de alguns tipos celulares no corpo humano. Células mieloides são a principal fonte da formação de leucotrienos, mas os linfócitos B também são capazes de produzi-lo (Cook-Moreau et al., 2007).

A enzima 5-LO possui um papel essencial não somente no desencadeamento de atividades pró-inflamatórias (mediada pela produção de LTB<sub>4</sub>), como também promove a síntese de fatores anti-inflamatórios como as lipoxinas (LXAs) que, através da ativação do receptor aril hidrocarbono (AhR), induzem a expressão de SOCS2 (*Supressor de Sinalização de Citocinas*) (Machado et al., 2006).

Lipoxinas são mediadores eicosanoides derivados da lipoxigenase que possuem potentes atividades anti-inflamatórias em inúmeras desordens do sistema imunológico como periodontite, artrite, nefrite, fibrose cística, tuberculose e toxoplasmose (Machado et al., 2006; Goh et al., 2003) que inibem a função de leucotrienos, de células NK, migração de leucócitos, produção de quimiocinas induzidas por TNF, adesão de moléculas e produção de IL-12 induzida por patógenos. Lipoxinas, são capazes de se ligarem a dois receptores: um receptor acoplado a proteína G (LXAR-FPRL) e um receptor citoplasmático (AhR) (Machado et al., 2006; Schaldach, Riby & Bjeldanes, 1999) em diversas células incluindo neutrófilos, promovendo a apoptose destas células no tecido e diminuindo sua transmigração; nos macrófagos, promovendo migração e estimulando a limpeza dos neutrófilos apoptóticos no tecido (Petasis et al., 2005).

Qiu e colaboradores demonstraram em 2001 que LXA<sub>4</sub>, assim como seu análogo a 15-epi-lipoxina A<sub>4</sub> (ou ATL, *Aspirin Triggered Lipoxin*) seriam capazes de induzir a expressão da proteína NAB1, que foi associada à atividade anti-inflamatória dos

glicocorticoides, agindo como cofator nuclear, suprimindo a transcrição de genes associados à atividade inflamatória em neutrófilos e células endoteliais.

Nosso grupo demonstrou em 2006 que sinalização de LXA<sub>4</sub> e ATL através de seus receptores ALX e AhR (Machado *et al.*, 2006) induz a expressão da proteína SOCS2 (*Supressor de Sinalização de Citocina*) a qual regulou a produção de citocinas e quimiocinas induzida por *T. gondii*.

SOCS constituem um grupo de proteínas intracelulares que foram identificadas em 1997 possuindo oito membros até o momento (CIS-SOCS e SOCS1-7); tais proteínas são caracterizadas por um domínio central SH2, um domínio C-terminal conservado chamado SOCS box e um domínio variável denominado N-terminal, cuja principal atividade é atenuar a transdução de sinal desencadeada por citocinas, através de sua interação direta com as cadeias citoplasmáticas de receptores ou via inibição de intermediários de sinalização da família Janus cinases (JAKs, do inglês, *Janus Kinase*) e das STATs (*Signal Transducer and Activators of Transcription*) (Stevenson *et al.*, 2004). Dentre os genes induzidos por STATs, estão os genes da família SOCS, especialmente SOCS1, SOCS2 e SOCS3.

SOCS podem modular a sinalização através dos receptores de citocinas por múltiplos mecanismos complementares, o qual SOCS1 e SOCS3 podem inibir a atividade de JAKs através de um domínio localizado em suas porções N-terminais conhecidos como KIR (*small Kinase Inhibitory Region*) (Yasukawa *et al.*, 1999). Também podem suprimir a sinalização competindo com transdutores de sinal subsequentes pelos sítios de ancoragem fosforilados nos receptores ativados (Ram & Waxman, 1999) e regular a transdução de sinal através da poliubiquitinação de seus substratos através da associação da SOCS box com a ubiquitinação.

Outro papel importante dessa família de proteínas é a capacidade de se regularem

mutuamente. SOCS2 pode ligar-se a SOCS1 e 3 através de um mecanismo que parece estar associado a SOCS *box* das proteínas alvo e da proteína SOCS2 promovendo uma regulação negativa das outras SOCS através da marcação com ubiquitina para a degradação via proteassoma (Tannahill *et al.*, 2005; Piessevaux *et al.*, 2006).

Em geral, as proteínas SOCS não são constitutivamente presentes nas células mas sua expressão pode ser induzida rapidamente através do estímulo com citocinas (Starr, R. and Hilton, D. J., 1998 ); essa indução se difere entre os diferentes genes SOCS.

Atualmente, em relação aos componentes imuno-regulatórios/repressores durante a infecção por *T. cruzi*, acredita-se que a evolução crônica dessa infecção esteja relacionada a uma resposta `a permanência de parasitas em órgãos-alvo da infecção, e que a resposta imune específica resulta em processo inflamatório exacerbado com conseqüentes efeitos negativos nesses tecidos (Marin-Neto *et al.*, 2007). Dentre os componentes exacerbados neste processo inflamatório, parece ser chave a presença de altos níveis de IFN- $\gamma$ . Este postulado parece paradoxal se levarmos em consideração que uma resposta anti-parasitária efetiva seria crítica para o controle da infecção e, conseqüentemente, impediria possível progressão para formas clínicas graves da doença. De fato, foi demonstrada uma correlação inversa entre níveis de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  e gravidade da doença de Chagas, indicando que resposta específica para peptídeos de *T. cruzi*, por células de memória produtoras de IFN- $\gamma$  são importantes no controle da infecção e na progressão para formas sintomáticas graves (Laucella *et al.*, 2004). Entretanto, o papel de SOCS2 na modulação da resposta imune e desenvolvimento de cardiomiopatia em humanos infectados com *T. cruzi* e no modelo experimental da doença de Chagas não é conhecido.

**Justificativa e**

**Objetivo Geral**



Respostas imunes do tipo 1 mediadas por células são cruciais para controlar a replicação de *T. gondii* e *T. cruzi in vivo*. LXAs modulam a resposta imune protetora durante a infecção *in vivo* com *T. gondii* e *M. tuberculosis*, participando ativamente na modulação das imunopatologias. LXAs induzem a expressão de SOCS2 em células dendríticas, o qual é o mediador principal das ações moduladoras desse ecosanóide. Coletivamente, esses dados sugerem a inter-relacionada, hipótese central, base dessa dissertação que: a modulação da expressão de SOCS2 é dependente da indução da via 5-LO e exerce um papel biológico importante no controle da resposta imune e desenvolvimento de patologias durante a infecção por *T. cruzi*.

Embora avanços substanciais tenham sido demonstrados na elucidação dos componentes moleculares relevantes, ambos derivados dos hospedeiros e patógenos, para indução e repressão da resposta imune contra microorganismos, várias questões permanecem obscuras. Os estudos desenvolvidos aqui têm como objetivo delinear a nova via 5-LO/SOCS2, de modulação da resposta imune, usando modelo experimental da doença de Chagas, assim contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias preventivas e terapêuticas contra essa infecção que é de grande importância para a saúde pública. Assim sendo, o **objetivo geral** do nosso estudo é:

“Investigar o papel de SOCS2 na modulação da resposta imune e desenvolvimento de miocardite durante a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*”.

# ***Material e Métodos***

## **1- Animais de experimentação**

Foram utilizados camundongos C57BL/6, sv 129, 5-LO “*Knockout*” (KO) e SOCS2 KO, fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade em todos os experimentos. Os animais C57BL/6 foram obtidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB-UFMG) e os camundongos sv 129, 5-LO KO e SOCS2 KO foram obtidos junto a colônia mantida e criada no biotério de criação do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG). Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob os números de protocolos 49/2009 e 89/2010.

## **2- Amostras de *Trypanosoma cruzi* e infecção experimental**

Foram utilizados parasitas da cepa Y que foram mantidas em camundongos C57BL/6. Os animais foram inoculados intraperitonealmente com  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas sanguíneas da cepa citada acima, diluída em PBS. A parasitemia foi verificada diariamente, coletando-se 5  $\mu$ l de sangue da veia caudal dos animais (Machado *et al.*, 2000). Em infecções realizadas *in vitro*, foram utilizadas formas tripomastigotas crescidas e isoladas de células epiteliais de rim de macaco (LLC-MK2).

## **3- Cultura de macrófagos, avaliação da produção de $\text{NO}_2^-$ e atividade microbicida**

Macrófagos residentes ou inflamatórios de animais C57BL/6 e SOCS2 KO foram colhidos por lavagem da cavidade peritoneal três dias após a injeção com 1 mL de tioglicolato de sódio a 3%. As células foram lavadas e cultivadas ( $1 \times 10^6$  células/mL) em

meio RPMI-1640 (Sigma), suplementado com 5% de soro bovino fetal (FBS), 50 $\mu$ M 2-mercaptoethanol, 2mM de L-glutamina e penicilina/estreptomicina (Gibco). As células aderentes foram obtidas após um período de 2-4 horas de incubação em placas de cultura a 37<sup>0</sup>C em câmara úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As células não aderentes foram removidas e, após incubação por 24 hs, as formas tripomastigotas foram adicionadas na proporção de 5:1 (parasitas/célula) e incubadas durante 3 horas. Após este período, os parasitas extracelulares foram removidos e as células foram incubadas a 37<sup>0</sup>C na presença de 5% de CO<sub>2</sub>, na ausência ou presença de 100ng/mL de interferon-gamma murino recombinante (IFN- $\gamma$ ) (Gibco). Os sobrenadantes foram removidos após 48 hs de infecção e análises da concentração de nitrito foram realizadas combinando-se 0,1 mL do sobrenadante da cultura com 0,1 mL do reagente de Griess. As amostras foram lidas 10 minutos mais tarde em uma absorbância de 540 nm e as concentrações de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> foram determinadas a partir das concentrações da curva padrão de 1 a 500  $\mu$ M de NaNO<sub>2</sub>. Para avaliarmos o crescimento dos parasitas, macrófagos foram infectados, os parasitas extracelulares removidos e as células foram incubadas com ou sem IFN- $\gamma$  como descrito acima. A análise da replicação intracelular de amastigotas foi avaliada em lâminas especiais (chamber slides; Nunc Inc) em uma concentração ajustada de 5x10<sup>5</sup> células.

#### **4- Células musculares cardíacas isoladas**

Os corações dos animais foram rapidamente isolados e colocados em um sistema Langendorff, sendo as células obtidas enzimaticamente conforme descrito previamente (Roman-Campos *et al.*, 2009). Resumidamente, os corações foram perfundidos por 5-10 minutos com uma solução livre de Ca<sup>2+</sup> contendo em mM: 130 NaCl, 5.4 KCl, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 0.33 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 piruvato, 22 glicose e 25 HEPES (pH 7.4). Logo após os corações foram

então perfundidos de 10-15 minutos a 37<sup>0</sup>C com uma solução contendo 1 mg/mL de colagenase tipo II (Worthington Biochemical Co, Freehold, NJ, USA). Os corações digeridos foram removidos da cânula e os ventrículos foram gentilmente agitados, centrifugados a 180g, durante 10 segundos a temperatura ambiente e estocadas em meio de cultura modificado Dulbecco's Eagle's (Sigma Chemical Com., St Louis, MO, USA). Os cardiomiócitos isolados foram mantidos a temperatura ambiente e usados em até 6 hs após o final da preparação. Apenas células tolerantes ao cálcio, quiescentes e com estrias bem definidas foram utilizadas.

## 5- Técnica de patch-clamp

Os registros de correntes foram obtidos por um amplificador de corrente elétrica da marca EPC-9.2 patch clamp amplifier (Heka Electronics, Germany) (Roman-Campos *et al.*, 2009), convertidos de forma análoga digital na frequência de 10 kHz utilizando-se filtro de 2.9kHz.

Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente (24-27<sup>0</sup>C) e os registros que apresentaram resistência em série (R<sub>s</sub>) maior que 7 MΩ foram excluídos das análises. A compensação foi realizada usando-se uma solução externa de Tyrode's contendo em mM: 140 NaCl, 5.4 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucose, 10 HEPES (pH 7.4 com NaOH). Para uma medida acurada de I<sub>Ca,L</sub>, as pipetas foram preenchidas internamente com uma solução contendo em mM: 120 CsCl, 20 TEACl, 5 NaCl, 10 HEPES, 5 EGTA, pH ajustado para 7.2 com CsOH. Inicialmente houve uma variação do potencial de membrana de -80 mV para -40 mV por 50 ms afim de inativar os canais para Na<sup>+</sup>. A partir de -40 mV foram visitados diferentes potenciais entre -40 a +50 mV com duração de 300 ms com saltos de 10 em 10 mV. Para correntes retificadoras de entrada de potássio (I<sub>kl</sub>) usou-se uma solução

contendo em mM: ): 130 K-aspartato, 20 KCl, 10 HEPES, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 NaCl, 5 EGTA, pH ajustado para 7.2 com KOH e extracelular (Tyrode). Foram feitos registros do potencial de ação (AP) de 30-50 AP por célula a 1 Hz até que uma condição estável fosse atingida permitindo assim o registro do PA. As correntes  $I_{to}$  foram obtidas através da variação do potencial de membrana de -40 mV até +70 mV com 3 s de duração e com frequência estimulatória de 0.066 Hz. A relação entre a corrente e a densidade foi obtida através da seguinte equação:

$$I_{(V)} = G_{\max} * \frac{(V_m - E_i)}{1 + \exp(V_m - V_{0.5})/S} \quad (1)$$

onde  $G_{\max}$  é a condutância máxima;  $V_m$  é o teste de potencial de membrana;  $E_i$  é o potencial de equilíbrio eletroquímico do íon;  $V_{0.5}$  é o potencial de membrana onde 50% dos canais são ativados e  $S$  é o fator *slope* (Roman-Campos *et al.*, 2009).

## 6- Ecocardiografia

Exames de ecocardiografia foram realizados em animais anestesiados com isofluran a 1.5% (Visual Sonics, Toronto, Canadá) com intuito de avaliar a função cardíaca. A morfologia do coração foi acessada usando a configuração modo-M. As medidas de volumes de fração de ejeção foram realizadas pelo modo-B bidimensional de acordo com a metodologia de Simpson's. Todos os parâmetros foram avaliados seguindo os protocolos da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Lang *et al.*, 2006).

## **7- Transiente de Cálcio (Ca<sup>2+</sup>)**

Cardiomiócitos isolados foram previamente incubados com sonda fluorescente sensível ao Ca<sup>2+</sup> (fluo4-AM 10 µM) durante 30 minutos em temperatura ambiente (25-30°C). Após a marcação, o excesso da sonda foi removido e adicionado novamente em meio para realização dos experimentos. As células foram plaqueadas, visualizadas no microscópio confocal e, no momento do experimento, estimuladas a 1 Hz. Para o registro do transiente de cálcio (Ca<sup>2+</sup>), foram realizadas varreduras ao longo de uma linha (512 x 3000 pixels), com laser de argônio (488 nm) e frequência de aquisição 1,54 ms.

As imagens de microscopia confocal foram realizadas em um microscópio Zeiss LSM 510 META (CEMEL, UFMG). Imagens digitais foram processadas cuidadosamente pelo programa de linguagem IDL (Research Systems, Boulder, CO, USA).

## **8- Quantificação dos níveis de LipoxinaA<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) e Citocinas**

A concentração de LXA<sub>4</sub> foi obtida usando anticorpos comercialmente disponíveis e de acordo com os procedimentos propostos pelo fabricante (Neogen). Níveis de IL-12 p40 e IFN-γ foram medidos através de Kits comercialmente disponíveis (ELISA kit - BD Biosciences Pharmingen and R&D Systems, respectivamente). Para experimentos *in vivo*, foram utilizados um mínimo de 5 animais por grupo que foram infectados como descrito acima e, em diferentes dias após a infecção esses animais foram sangrados e o soro utilizado para a detecção dos níveis de citocinas. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). O ensaio foi feito de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. Resumidamente, adicionou-se o anticorpo de captura específico, que foi

incubado por 18h a 4°C. Após esse tempo a placa foi lavada e bloqueada por 2hs. Colocamos as amostras diluídas e os padrões de citocinas a partir de concentrações decrescentes para estabelecimento da curva padrão de diluição recomendada pelo kit. As placas foram incubadas por mais 18h/ 4°C. O anticorpo de detecção foi adicionado em cada placa, e incubado por duas horas. A placa foi novamente lavada e uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase (Pharmingen) foi adicionada. Após 30 minutos, a placa foi novamente lavada e depois foi adicionado o tampão de substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck). O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em um leitor de placas de ELISA (450 nm) (Molecular Devices, USA).

## **9- Extração de RNA**

A extração de RNA total foi realizada utilizando-se coração e baço de animais controles e infectados, de acordo com as recomendações do fabricante reagente Brazol (LGC Biotecnologia). Brevemente, 1 mL do reagente Brazol foi adicionado para cada 1 mg de tecido. Após homogeneização foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de suspensão. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C e a fase aquosa transferida para um novo tubo. O mesmo volume de isopropanol foi adicionado, agitado no vórtex e incubado por 20 minutos a -20°C para precipitação do RNA de fase aquosa. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado em etanol 75% e suspenso em água a uma concentração de 0.5 mg/mL. A quantificação das amostras de RNA foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (Nano Drop Technologies, Wilmington, DE, EUA). A leitura do branco foi realizada com água tratada com DEPC. O RNA foi



quantificado pela absorbância a 260nm utilizando-se 1µL da amostra pura. O aparelho fornece a concentração em ng/µL. A reação de transcrição reversa do mRNA dos tecidos animais foi realizada utilizando-se 2µg de RNA de cada amostra, aos quais foi adicionado 50µM do *primer* Oligo dT (15) (Promega Cor., Madison WI, EUA). Foi feita uma incubação por 5min a 70°C e em seguida por 5 minutos no gelo. Em seguida, foi adicionada uma mistura de reagentes contendo 1µL de dNTPs a 10 mM (Promega Cor., Madison, WI, EUA), 4µL tampão M-MLV 5X (Promega Cor., Madison WI,EUA) e 200U da enzima Transcriptase reversa-M-MLV (Promega Cor., Madison WI, EUA) e 8,5µL de água Milli-Q autoclavada. A mistura foi incubada por 2 horas a 42°C quando ocorreu a transcrição reversa do mRNA. As amostras de cDNA foram conservadas a -20°C.

#### **10- Detecção de mRNA para citocinas, *T. cruzi* e SOCS**

A expressão do mRNA para as citocinas (IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), SOCS1, SOCS2, SOCS3 e  $\beta$ -actina foram analisadas por RT-PCR com GoTaqGreen Master Mix (Promega) em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA). As condições da reação foram de 34 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 60° C e 1 minuto a 72° C, com uma extensão final de 2 min a 72° C. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose e corados por brometo de etídeo. A seqüência de primers e os produtos do PCR foram descritos por Machado e colaboradores (Machado *et al*, 2006).

## 11- Cultura celular de baço

Suspensões de esplenócitos de animais controles e cronicamente (6 meses) infectados com *T. cruzi* foram lavados em solução salina balanceada de Hanks' (HBSS) e tratados com tampão de lise (9 partes de 0.16 mM de cloreto de amônio e 1 parte de 0.17 mM de Tris-HCl, pH 7.5) por 4 minutos. As células foram então lavadas 3 vezes em HBSS e ajustadas para uma concentração de cel/mL em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 2-mercaptoetanol (Invitrogen), L-glutamina (Gibco) e penicilina/estreptomocina (Gibco). As suspensões celulares foram cultivadas em placas de cultura (1 mL/poço, Nunc) durante 48 horas a 37°C, na presença de 5% de CO<sub>2</sub> na ausência ou presença de formas tripomastigotas (5 parasitas/célula) ou de antígeno de *T. cruzi* (10 µg/mL). Os sobrenadantes foram então colhidos e os níveis de IFN-γ foram analisados usando-se Kit de ELISA comercial (R&D Systems).

## 12- Análise de Citometria de fluxo

Esplenócitos foram obtidos de animais infectados com *T. cruzi* (0, 8, 15 ou 29 dpi) como descrito acima. Esplenócitos de animais de 0 e 15 dpi foram retirados, lavados, plaqueados e incubados com Brefeldina A (1 µg/mL) (Invitrogen). 4 horas após incubação, as células foram fixadas (formaldeído 2% em PBS) e marcadas com anticorpos específicos para IFN-γ (FITC), CD4 (PE) ou CD8 (PerCP) (Pharmingen). Células retiradas do baço e do timo 0, 8 15 e 29 dpi foram retiradas, lavadas e diretamente marcadas com uma combinação de anticorpos específicos CD4 (PerCP), CD25 (PE) e FOXP3(FITC). Células viáveis foram analisadas por Citometria de Fluxo usando o citômetro FACScan (Becton Dickinson, San José, CA, USA) e o software Flowjo através da delimitação de *gates* onde

as populações celulares em estudo situam-se de acordo com o seu tamanho e granulosidade e com os marcadores específicos de cada população.

### **13- Histologia do coração, análise morfométrica e parasitismo**

Para compararmos os efeitos da expressão de SOCS2 no influxo de células inflamatórias no coração, nós analisamos os parâmetros e a intensidade da miocardite por morfometria. Para este experimento, corações de 3 animais de cada grupo foram removidos 15 dpi e cortados transversalmente. Cada coração foi lavado em PBS e fixado em 4% de tampão fosfato formaldeído. Após 24 horas de fixação, os tecidos foram embebidos em parafina, e 3 cortes semi-consecutivos (de 5  $\mu\text{m}$  de espessura) foram marcados por H&E para avaliação da inflamação ou marcados com Tricômico de Gomori para avaliação da fibrose. A inflamação e fibrose no coração foram avaliadas em ambos, átrio e ventrículo, e no septo interventricular em cinco campos de cada corte marcados por H&E ou por Tricômico. Os cortes foram randomicamente escolhidos na objetiva de 20X e as áreas do miocárdio foram analisadas em  $1.5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  por campo. Imagens foram capturadas em uma resolução de 1392 x 1040 pixels com uma microcâmera Cool SNAP-Pro (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) e analisados em Image-Pro Express versão 4.0 (Media Cybernetics) e em software KS300 (Zeiss, Jena, Germany). Um captador automático (algoritmo do software KS300) foi elaborado para captura, processamento e segmentação da imagem, definição de condições de morfometria e contagem de todas as células detectadas em cada imagem. Os núcleos de cada célula presentes nos campos analisados foram contados e expressados como céls/campo. As áreas de fibrose foram avaliadas empregando-se a função de segmentação da imagem. Todos os pontos (pixels) em azul nos cortes com Tricômico, foram selecionados para construção de uma imagem

binária e subsequentemente para calcular a área total ocupada (fibrose por área/corte). O parasitismo cardíaco foi quantitativamente avaliado pela contagem do número de ninhos de parasitas em 3 cortes semi-consecutivos como visualizados por microscopia na objetiva de 40X.

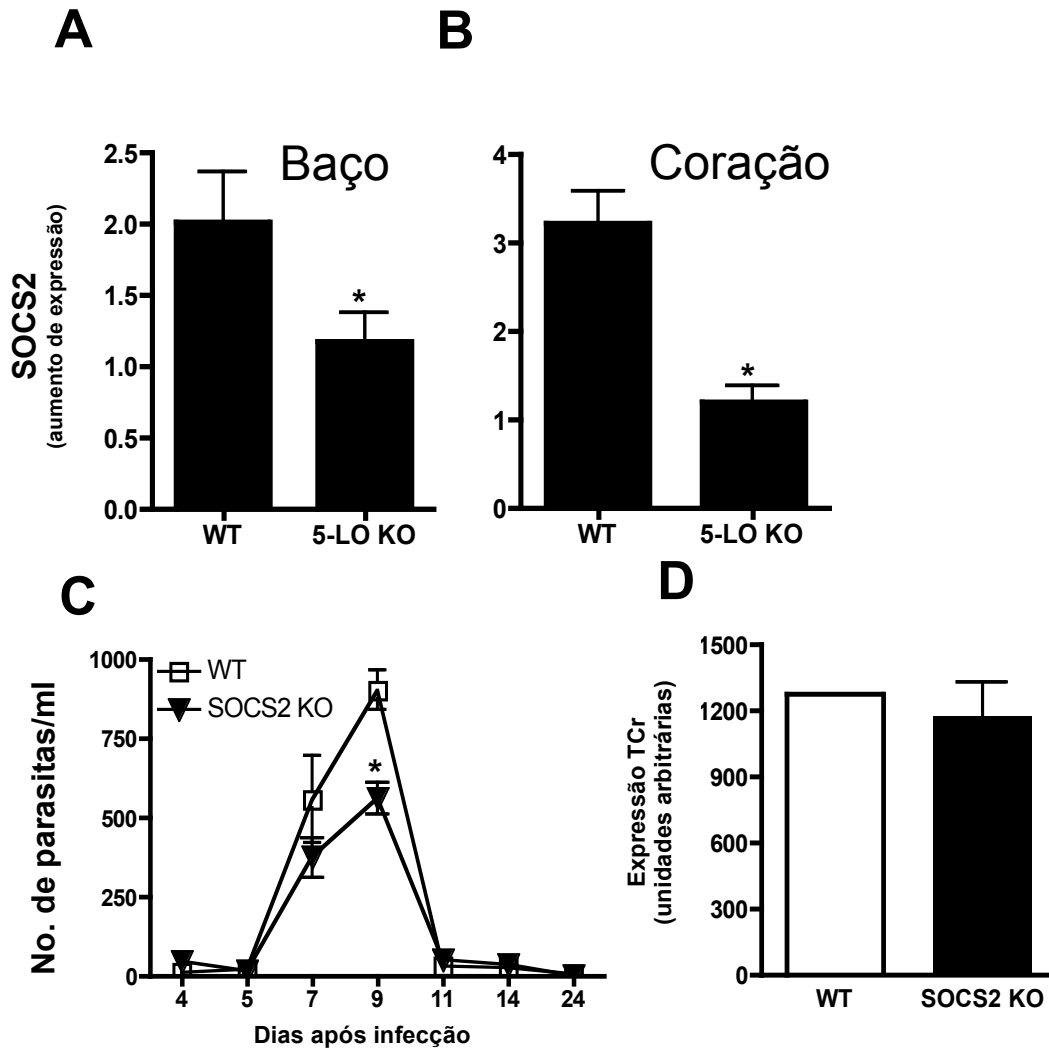
#### **14- Análise estatística**

A significância estatística das diferenças nos valores entre amostras controles ou tratadas foram analisados pelo teste t Student's (Student's t test) ou One or Two-way ANOVA com o teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas ser significantes com um  $P$  igual ou  $< 0.05$ .

# **Resultados**

## **1) O curso natural da infecção por *T. cruzi* é modulado pela expressão de SOCS2 a qual é parcialmente dependente de 5-LO**

A ativação da enzima 5-LO e a produção de mediadores eicosanóides, principalmente de LXA, estão envolvidos na modulação da expressão de SOCS2. Primeiramente analisamos se SOCS2 era induzido durante a infecção *in vivo* com *T. cruzi*, e se sua expressão era dependente da enzima 5-LO. Para isso, nós infectamos animais WT e 5-LO KO intraperitonealmente com 1000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e, após 15 dias de infecção, baço e coração foram retirados e a quantificação da expressão de SOCS2 foi realizada por PCR. A expressão de SOCS2 foi diminuída no baço e coração de animais 5-LO KO infectados quando comparados aos animais WT (Figuras 1A, B). Para avaliarmos a parasitemia, animais WT e SOCS2 KO foram infectados, como descrito acima, e a parasitemia foi avaliada em diferentes dias após a infecção. Houve uma significativa redução da parasitemia em animais SOCS2 KO infectados quando comparados aos animais WT (Figura 1C). Entretanto, por PCR detectamos a mesma quantidade de parasitas (DNA) no coração desses animais, indicando que o parasitismo mostrou-se similar entre os animais WT e SOCS2 KO (Figura 1D).



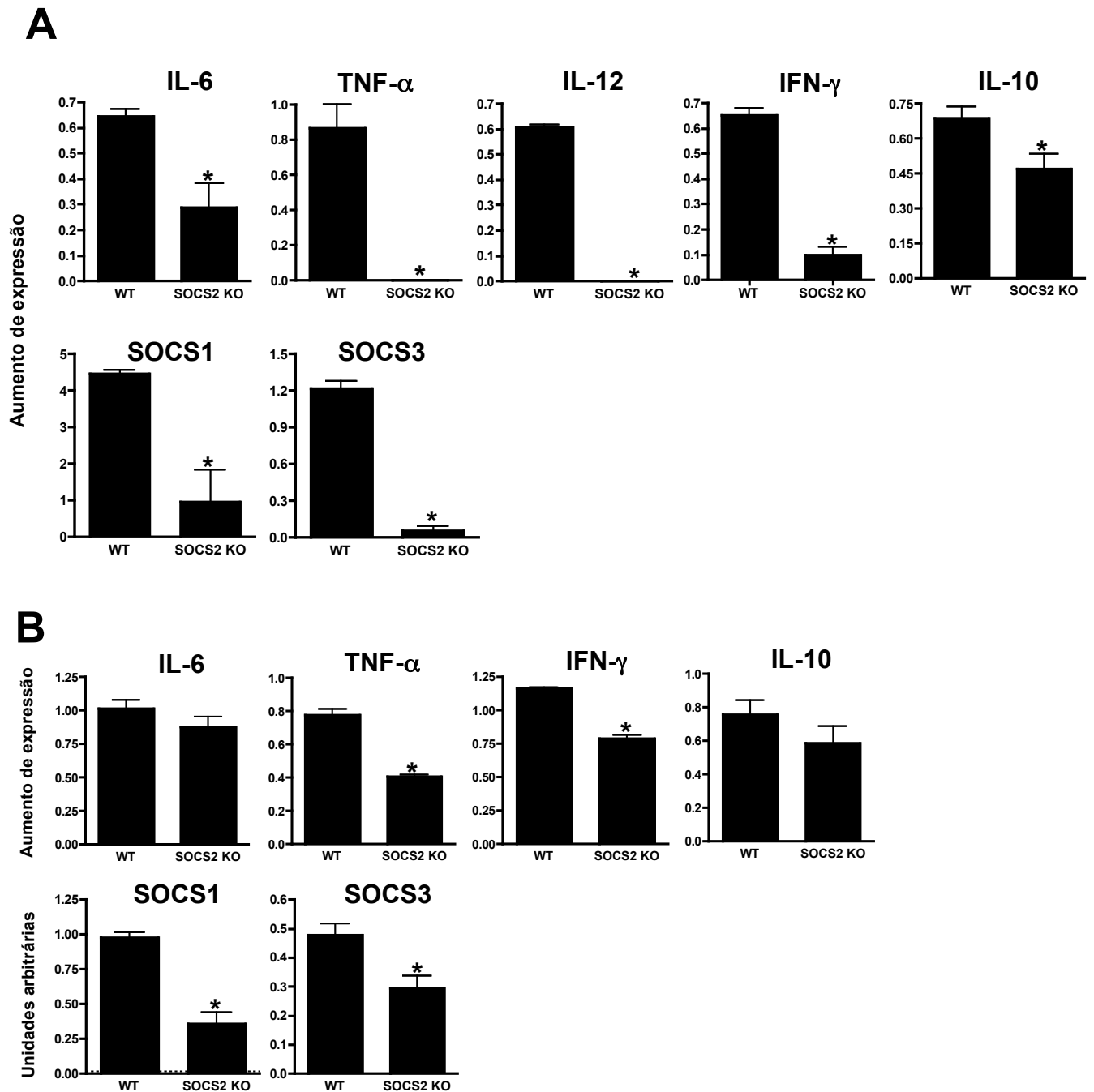
**Figura 1. Expressão reduzida de SOCS2 no baço e coração de animais 5-LO KO 15 dias após infecção (dpi).** (A-C) Animais wild-type (WT), 5-LO KO e SOCS2 KO foram infectados intraperitonealmente com 1000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e (A, B), baços e corações de animais WT e 5-LO KO foram retirados, homogenizados e a extração de mRNA foi realizada. RT-PCR foi realizado usando primers específicos para os genes SOCS2 e  $\beta$ -actina. Os dados foram normalizados para a expressão de  $\beta$ -actina e para animais controles não infectados. (C) Curso natural da infecção por *T. cruzi*, analisado pela parasitemia de animais WT e SOCS2 KO. (D) Expressão de mRNA para *T. cruzi* no coração 15 dpi. Os dados mostram a média e o desvio padrão (+/- SD) do número de parasitas/microlitro de sangue e são representativos de dois experimentos independentes (8 animais /grupo). \*  $p < 0.001$  para comparação de camundongos SOCS2 KO versus WT infectados com *T. cruzi*.

## **2) Deficiência de SOCS2 resulta na diminuição de citocinas pró-inflamatórias, SOCS1 e SOCS3 durante a infecção com *T. cruzi***

Durante a infecção pelo *T. cruzi* ocorre a liberação de mediadores inflamatórios cujo objetivo principal é o controle da infecção. Entretanto, com uma exacerbada produção desses mediadores inflamatórios, graves danos ao hospedeiro poderão ocorrer levando ao desenvolvimento de patologias; por outro lado, com uma produção ineficiente para controlar a infecção, poderá ocorrer a multiplicação do parasito ocasionando a morte do hospedeiro. Portanto, a resposta Th1 é essencial no controle da infecção e mediadores antiinflamatórios são importantes para que haja um balanço da resposta imune. Assim, nosso próximo passo, foi investigar a resposta imune contra a infecção por *T. cruzi* em animais deficientes de SOCS2.

Baço e coração de animais WT e SOCS2 KO infectados ou não por *T. cruzi* foram removidos, processados e os níveis de expressão de citocinas, SOCS1 e SOCS3 avaliados por PCR. Houve uma significativa diminuição da expressão das citocinas IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-10 no baço (Figura 2A) e de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no coração (Figura 2B) de animais SOCS2 KO infectados com *T. cruzi* quando comparados com animais WT. A infecção nos animais SOCS2 KO também resultou em uma diminuição da expressão de SOCS1 e SOCS3 no baço e coração desses animais (Figuras 2A, B).

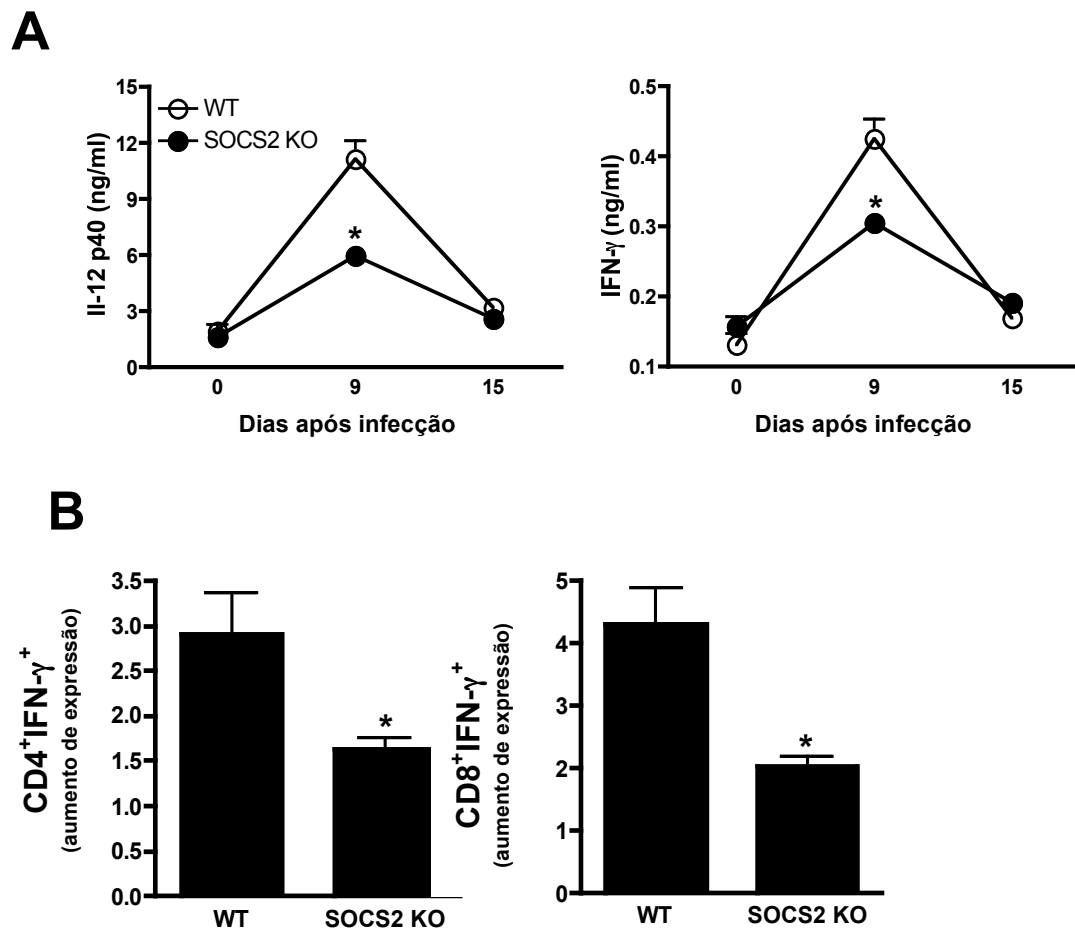




**Figura 2. Expressão reduzida de citocinas inflamatórias, SOCS1 e SOCS3 no baço e coração de animais SOCS2 KO infectados.** Animais wild-type (WT) e SOCS2 KO foram infectados intraperitonealmente com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi*. 15 dpi, baços (A) e corações (B) foram retirados, homogenizados e RT-PCR realizado usando primers específicos para os genes representados. Os dados foram normalizados para a expressão de  $\beta$ -actina e de animais controles. Os dados são representativos da média  $\pm$  SD de dois experimentos independentes. \*  $p < 0.05$  para a comparação de animais SOCS2 KO versus WT infectados com *T. cruzi*.

### 3) A ativação de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e a produção de IL-12 e INF- $\gamma$ são modulados por SOCS2

Uma diminuição sistêmica das concentrações de IL-12 p40 e IFN- $\gamma$  (determinadas por ELISA) foi observada nos animais SOCS2 KO após 9 dias de infecção quando comparados com animais WT (Figura 3A). A deficiência de SOCS2 também ocasionou a redução da expressão/número de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> positivas para IFN- $\gamma$  durante a infecção quando comparados com animais WT (Figura 3B).



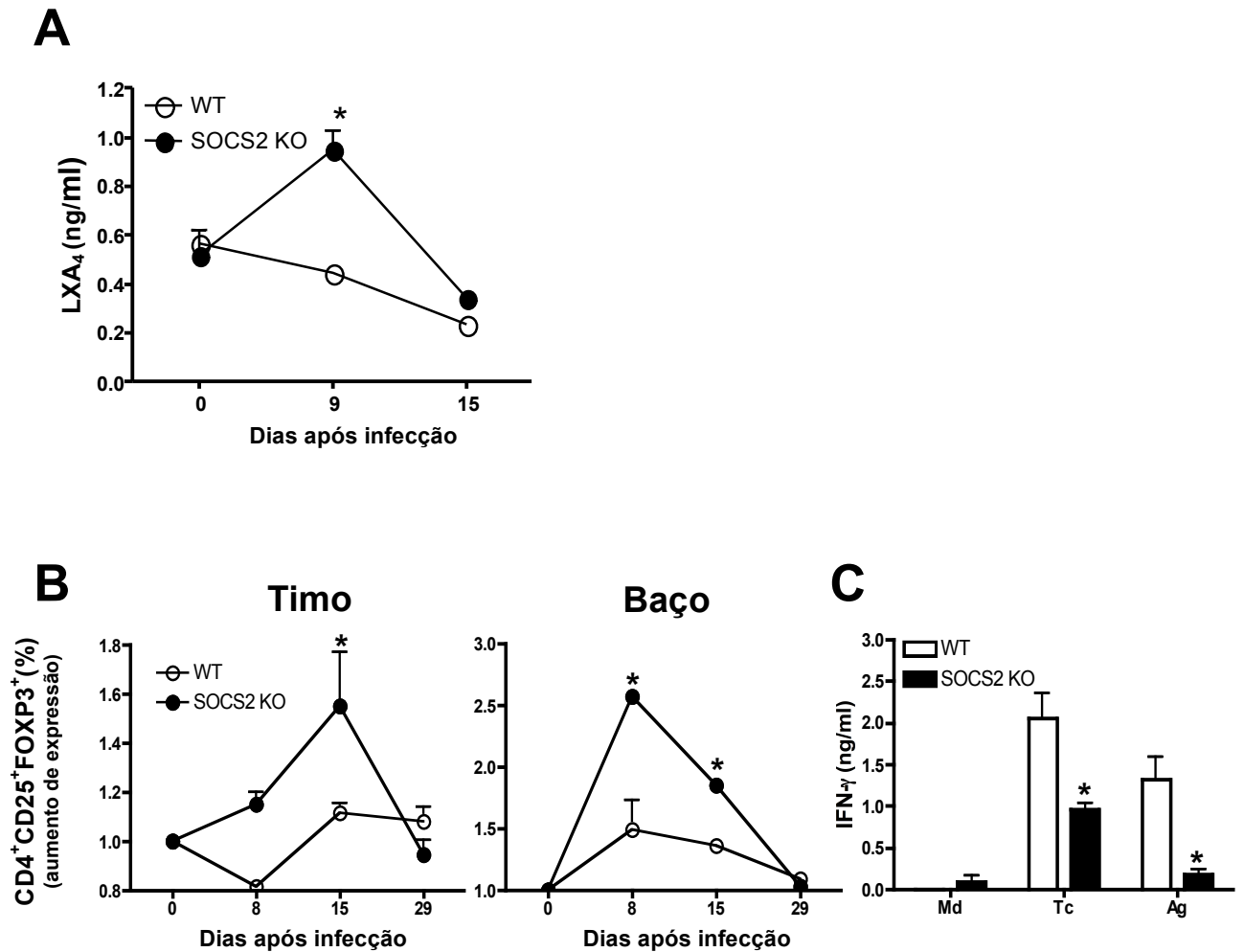
**Figura 3. Modulação da produção de IL-12, IFN- $\gamma$  e geração de células T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> por SOCS2 durante a infecção por *T. cruzi*. (A) Concentrações reduzidas de IL-12 p40 e IFN- $\gamma$  foram observadas no soro de animais SOCS2 KO infectados 9 dpi quando comparados aos animais WT por ELISA. (B) Esplenócitos de animais WT e SOCS2 KO infectados com *T. cruzi* foram obtidos 15 dpi, incubados com Brefeldina durante 4hs, seguidos de detecção intracelular de IFN- $\gamma$  em células TCD4<sup>+</sup> ou TCD8<sup>+</sup> por citometria de fluxo. Os dados correspondem a média +/- SD e são representativos de dois**

experimentos independentes. \*  $p < 0.05$  na comparação de animais SOCS2 KO versus WT infectados com *T. cruzi*.

#### **4) Camundongos SOCS2 KO infectados com *T. cruzi* aumentam a produção de Lipoxina e geração/expansão de células T reguladoras e falham na indução de células de memória**

Para investigarmos as bases de nossas observações, nós determinamos a produção de Lipoxinas (LXA<sub>4</sub>) e a geração/expansão de células T regulatórias (Treg) durante a infecção pelo *T. cruzi*.

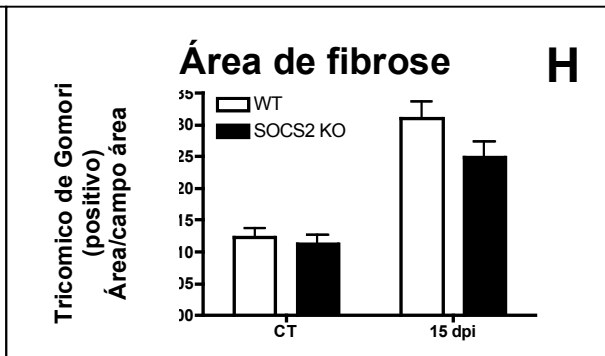
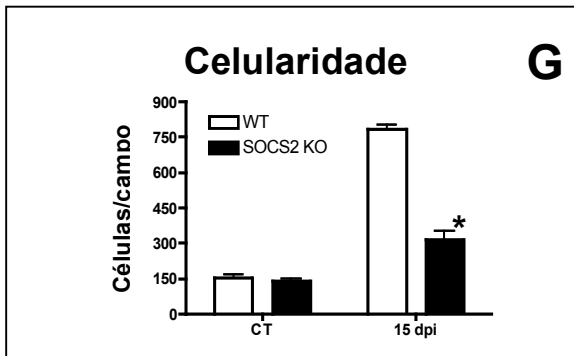
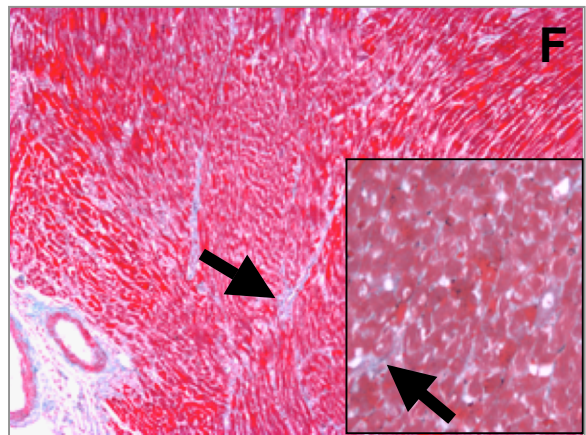
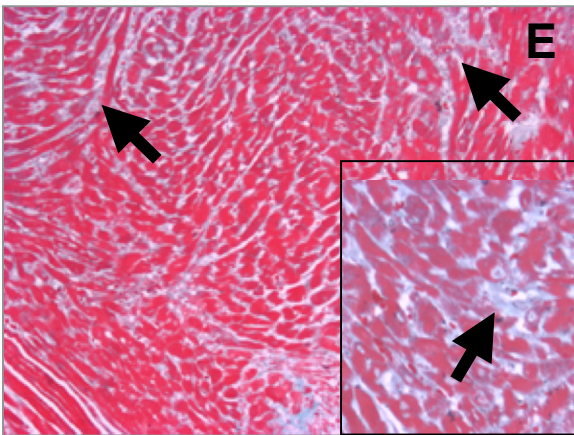
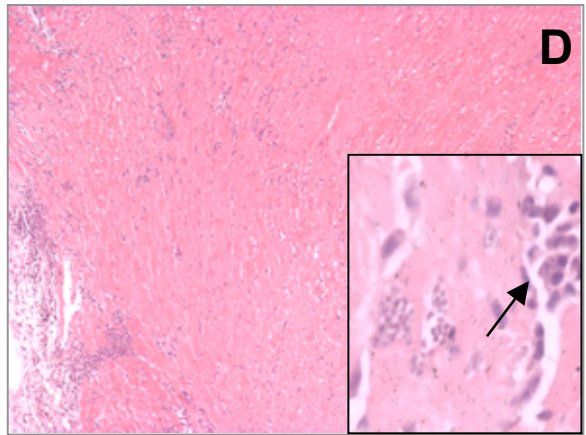
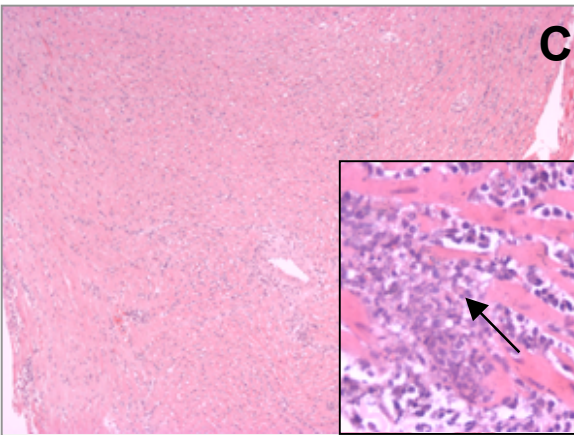
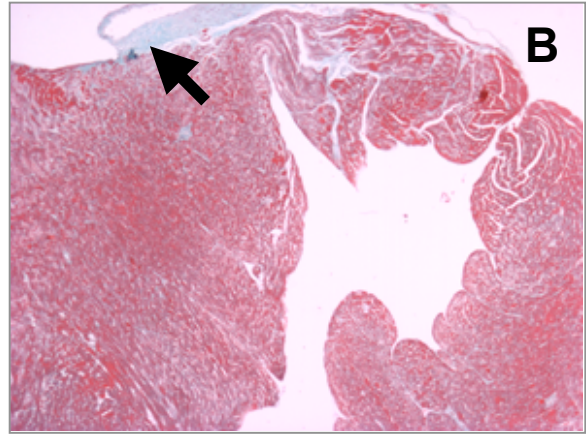
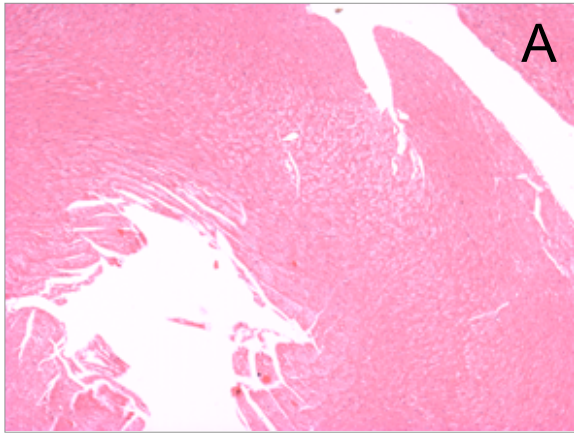
Observamos uma alta concentração de LXA<sub>4</sub> no baço (Figura 4A) e um aumento do número de células Treg no timo e no baço de animais SOCS2 KO infectados quando comparados com animais WT (Figura 4B). Adicionalmente, a deficiência de SOCS2 resultou em uma diminuição da geração de células T de memória específicas para *T. cruzi*. Esplenócitos de camundongos deficientes de SOCS2 cronicamente infectados (6 meses) produziram concentrações reduzidas de IFN- $\gamma$  durante o “*recall response*” *in vitro* quando comparados com animais WT infectados (Figura 4C).



**Figura 4. Modulação da produção de LXA<sub>4</sub> e da geração de células regulatórias e de memória em animais SOCS2 KO infectados com *T. cruzi*.** (A) Concentrações aumentadas de LXA<sub>4</sub> foram observadas no baço de camundongos SOCS2 KO infectados com *T. cruzi* quando comparados com animais WT por ELISA. (B) Esplenócitos e tímócitos foram preparados nos tempos 0, 8, 15 e 29 dpi para detecção de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> por citometria de fluxo. (C) Esplenócitos de animais WT e SOCS2 cronicamente infectados (6 meses) com *T. cruzi* foram incubados com meio, formas tripomastigotas (Tc) ou com antígeno (Ag) *in vitro* durante 48 hs. A incubação foi seguida de detecção da quantidade de IFN- $\gamma$  no sobrenadante das células por ELISA. Os resultados mostram a média +/- SD e são representativos de dois experimentos independentes. \*  $p < 0.05$  para comparação de animais SOCS2 KO versus WT infectados.

## **5) SOCS2 modula o desenvolvimento da miocardite durante a infecção experimental por *T. cruzi***

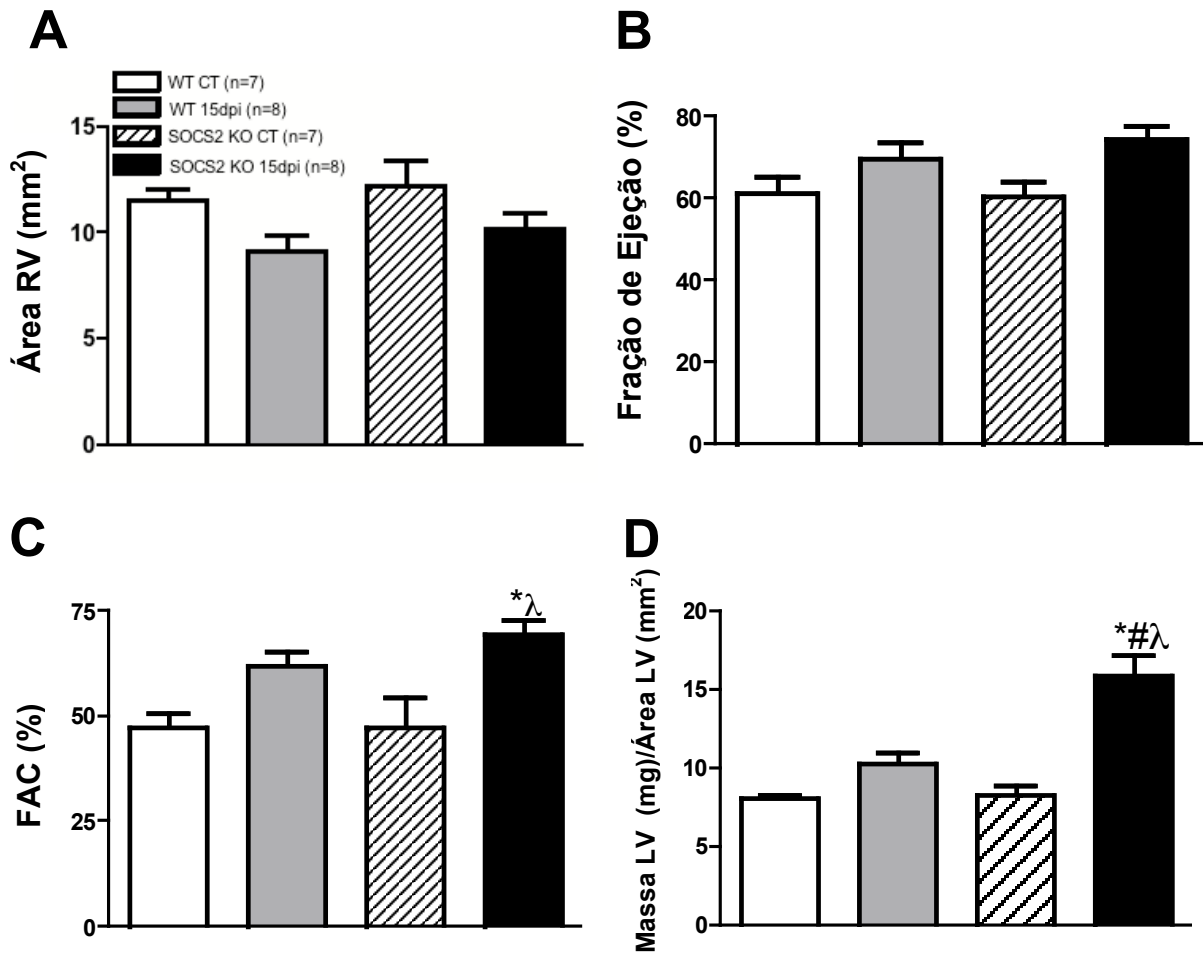
Nós examinamos o impacto da deficiência de SOCS2 no desenvolvimento de miocardite induzida pela infecção com *T. cruzi*. Houve uma intensa miocardite linfocítica e deposição de colágeno no miocárdio de animais WT 15 dpi (Figura 5). Em contraste, em animais deficientes de SOCS2 infectados com *T. cruzi*, encontramos apenas uma moderada miocardite com alguns ninhos de células inflamatórias.



**Figura 5. Redução de miocardite em animais SOCS2 KO infectados (15 dpi).** Cortes histológicos do tecido cardíaco de animais WT (A, C e E) e SOCS2 KO (B, D e F), controles (A e B) ou infectados (C-F) com 1000 formas tripomastigotas foram obtidos e corados com H & E e com Tricômico de Gomori. As setas indicadas em C e D mostram o infiltrado inflamatório e as setas indicadas em E e F as áreas de fibrose no tecido. Em G temos a contagem do infiltrado inflamatório e em H da área de fibrose cardíaca. \*  $p < 0.001$  para a comparação de animais SOCS2 versus WT infectados com *T. cruzi*. Visualização original de 4X (A,B), 10X (C,D), 20X (E,F) e 40X (C-F insertos). Os resultados mostram a média +/- SD e são representativos de dois experimentos independentes. \*  $p < 0.05$  para comparação de animais SOCS2 KO versus WT infectados.

## **6) Ausência de SOCS2 durante a infecção por *T. cruzi* resulta no aumento de hipertrofia**

O decaimento da função cardíaca é uma fonte significativa de mortalidade, tanto em modelo experimental como em humanos que sofrem da doença de Chagas. Os efeitos da deficiência de SOCS2 na modulação da resposta imune e desenvolvimento de miocardite durante a infecção pelo *T. cruzi* nos levou a investigar a evidência de disfunção do miocárdio nesses animais. Exames de ecocardiograma realizados 15 dpi revelaram que animais WT e SOCS2 KO infectados não tiveram diferenças significativas na área do ventrículo direito (RV) e na fração de ejeção quando comparados com corações de animais controles (Figuras 6A, B). No entanto, animais SOCS2 KO infectados apresentaram um aumento da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FAC) o que não foi observado nos animais WT (Figura 6C). Além disso, nós observamos que houve uma hipertrofia cardíaca representada pelo aumento da massa ventricular esquerda (LV) corrigida pela área em animais SOCS2 KO quando comparados com animais WT durante a infecção (Figura 6D).

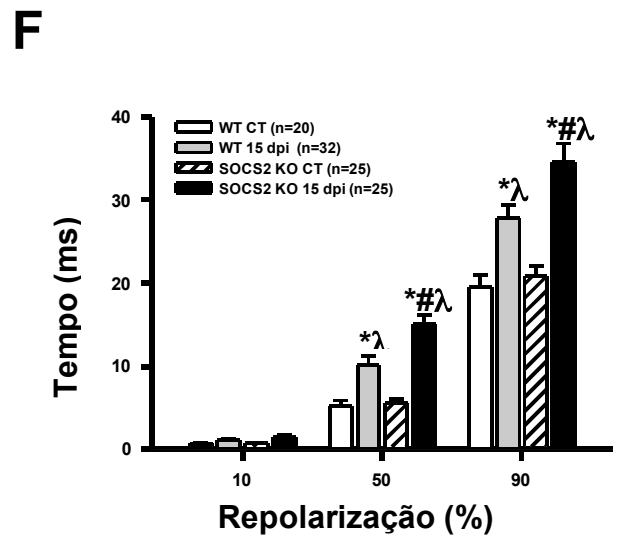
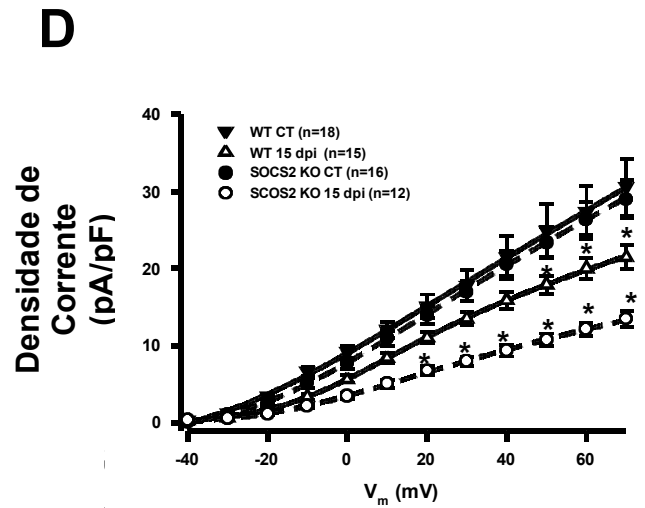
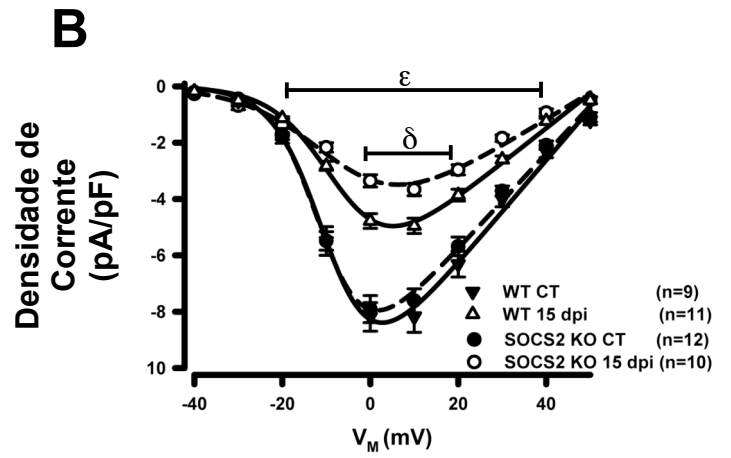
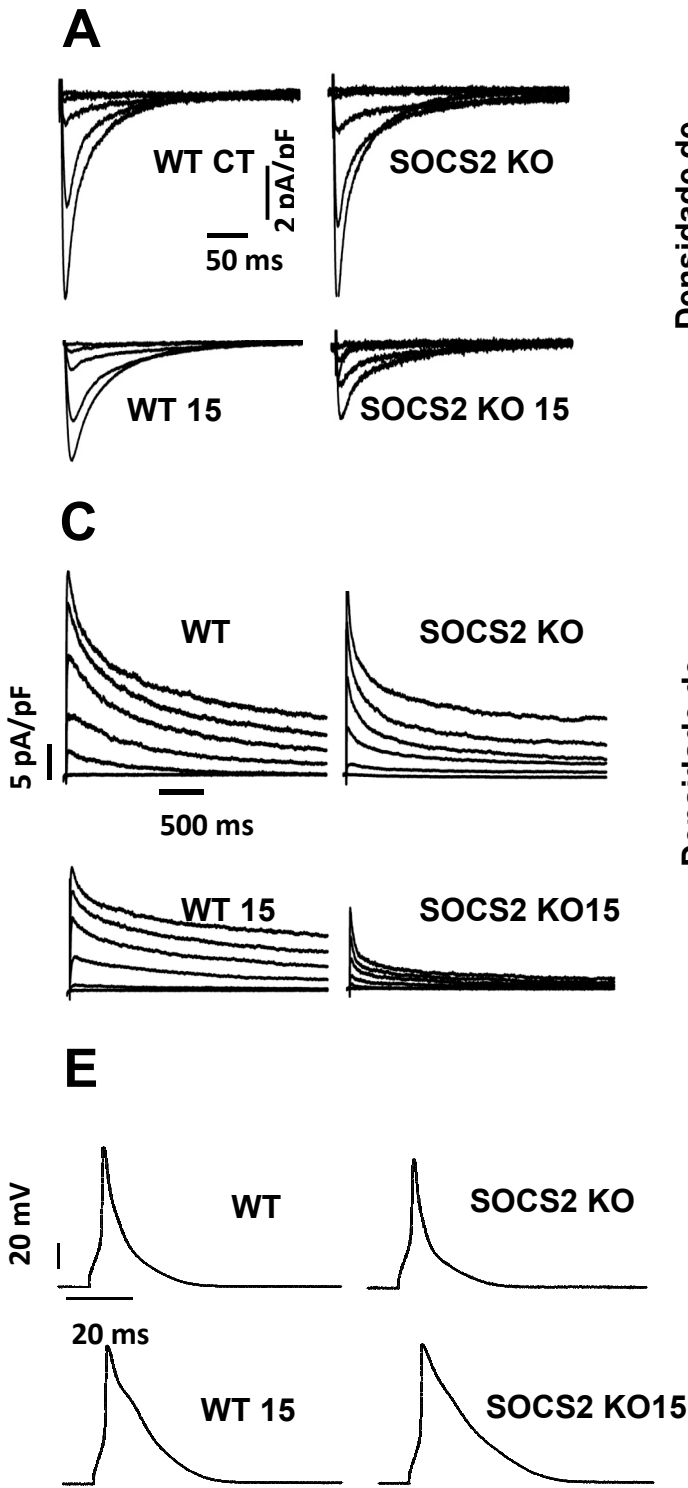


**Figura 6. Deficiência de SOCS2 resulta em aumento de hipertrofia cardíaca em animais infectados com *T. cruzi* 15 dpi.** (A-D) A função cardíaca de animais WT e SOCS2 infectados com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram analisadas por Ecocardiografia. (A) Área do ventrículo direito (RV), (B) fração de ejeção (EF), (C) fração da área circunferencial e (D) Hipertrofia ventricular esquerda (LVH) foram computadas a partir da massa (mg)/ LV área do ventrículo esquerdo (mm<sup>2</sup>). \*, #, λ =  $p < 0.05$  SOCS2 KO versus WT.



## **7) Deficiência de SOCS2 ocasiona alterações eletrofisiológicas em cardiomiócitos durante a infecção por *T. cruzi***

Técnicas de Patch-clamp e microscopia confocal foram empregadas para avaliar a fisiologia dos cardiomiócitos, uma vez que, mudanças nas propriedades eletrofisiológicas e no manuseio de cálcio são as principais causas de falhas cardíacas. Nós observamos uma redução nas correntes de cálcio e de potássio em cardiomiócitos isolados de animais SOCS2 KO 15 dpi quando comparados aos animais WT infectados (Figuras 7A, B, C e D). Entretanto, em animais WT e SOCS2 KO controles, as correntes de cálcio, potássio e a repolarização do potencial de ação foram quase idênticas. Além disso, animais SOCS2 KO infectados mostraram um aumento no tempo de repolarização do potencial de ação quando comparados com animais WT (Figuras 7E, F).

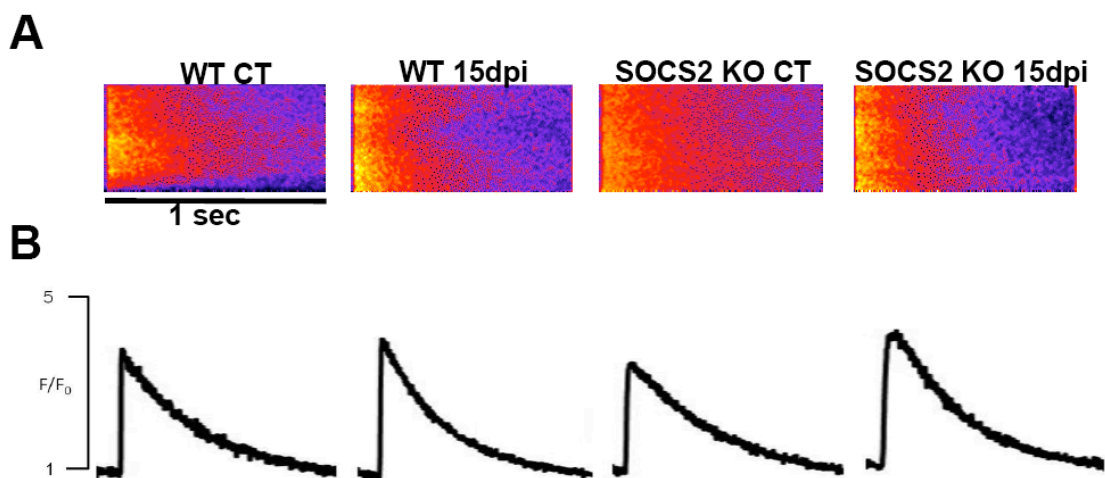


**Figura 7. Deficiência de SOCS2 altera características eletrofisiológicas de cardiomiócitos durante a infecção com *T. cruzi*.** (A) Representação da corrente de cálcio tipo-L capturadas a partir de animais WT controles (CT), WT 15 dpi, SOCS2 KO CT e SOCS2 KO 15 dpi. (B) Voltagem dependente de cálcio I<sub>Ca, L</sub>, plotados como densidade de corrente (pA/pF) de -40 a 50 mV. (C) Representação do transiente da corrente de potássio (I<sub>to</sub>) obtidos a partir de animais WT CT, WT 15 dpi, SOCS2 KO CT, SOCS2 KO 15 dpi. (D) Voltagem da dependência I<sub>to</sub> plotadas como densidade de corrente (pA/pF) de -40 a 70 mV. (E) Representação do potencial de ação (AP) de animais WT CT, WT 15 dpi, SOCS2 KO CT, SOCS2 KO 15 dpi. (F) Gráfico demonstrativo comparando o tempo de repolarização do potencial de ação em diferentes níveis de repolarização. n = número de células. (B)  $\epsilon = p < 0.05$  SOCS2 KO 15 dpi e WT 15 dpi versus WT e SOCS2 KO CT.  $\delta = p < 0.05$  SOCS2 KO 15 dpi versus WT 15 dpi. (D) \* =  $p < 0.05$  WT 15 dpi e SOCS2 15 dpi versus WT e SOCS2 KO CT. (F) Os parâmetros foram significativamente aumentados em animais SOCS2 KO infectados. \*, #,  $\lambda = p < 0.05$  versus WT CT, WT 15 dpi, SOCS2 KO CT respectivamente. dpi = dias pós infecção.

## 8) Transiente de cálcio em cardiomiócitos durante a infecção por *T. cruzi*: modulação por SOCS2

O  $\text{Ca}^{2+}$  possui papel chave na regulação da função cardíaca e alterações de  $\text{Ca}^{2+}$  podem influenciar a fisiologia e a patologia dos cardiomiócitos (Bers, 2002a; 2006b). Por isso, decidiu-se investigar possíveis alterações na sinalização intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  nos cardiomiócitos dos animais deficientes de SOCS2. Para isso, miócitos ventriculares dos animais WT e SOCS2 KO foram incubados com sonda fluorescente sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Flúor-4/AM), estimulados na frequência de 1 Hz e a razão entre a fluorescência máxima e mínima ( $F/F_0$ ) foi analisada para a obtenção do pico do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . A Figura 8A mostra uma imagem representativa do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares. Os resultados apresentados na Figura 8B mostram que os cardiomiócitos de animais SOCS2 KO apresentaram uma redução significativa do pico do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , quando comparados aos animais WT, sugerindo uma possível diminuição na função contrátil

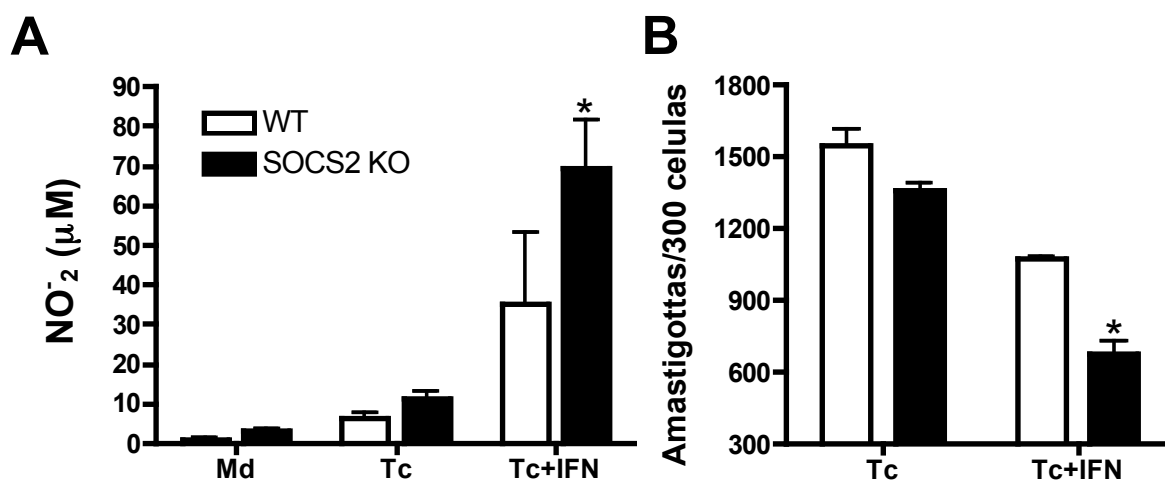
dessas células. Pode-se observar um aumento na amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  em ambos os grupos infectados com *T. cruzi*. Outro parâmetro observado foi o decaimento do pico do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Aqui, verificou-se o tempo decorrido para que o pico do transiente decaísse em 50% do seu valor máximo (T50). O resultado obtido mostra que o valor de T50 foi maior nos miócitos ventriculares dos animais SOCS2 KO, quando comparados aos cardiomiócitos de camundongos WT. Em outras palavras, a velocidade na qual o  $\text{Ca}^{2+}$  é retirado do citosol, após a contração, foi menor nas células ventriculares dos SOCS2 KO. Esse resultado sugere, mais uma vez, a disfunção na sinalização intracelular de cálcio em cardiomiócitos ventriculares de camundongos SOCS2 KO. Essa disfunção pode estar relacionada com as alterações cardíacas observadas nesse modelo.



**Figura 8. Alteração no manuseio de cálcio em cardiomiócitos ventriculares de animais SOCS2 KO.** A infecção com *T. cruzi* aumenta o pico da amplitude do transiente de cálcio de cardiomiócitos obtidos de animais WT e SOCS2 KO, porém ocorre a mudança no decaimento somente em animais deficientes de SOCS2. (A) Representação de imagens de microscopia confocal do transiente de cálcio intracelular em miócitos ventriculares estimulados eletricamente. (B) Representação do escaneamento das linhas do transiente de cálcio  $\text{Ca}^{2+}$ . CT= animais não infectados e dpi = dias após a infecção.

## 9) Atividade tripanocida e produção de óxido nítrico aumentados por macrófagos deficientes de SOCS2

Nossos recentes resultados *in vivo* (Figura 1C) sugerem que há uma resistência a infecção (replicação do parasita). Macrófagos são células descritas como sendo as principais no controle da replicação do parasita durante a infecção experimental por *T. cruzi*. Portanto, iniciamos experimentos *in vitro* para avaliar o papel de SOCS2 na atividade tripanocida/microbiostática de macrófagos. Nossos resultados *in vitro*, demonstraram que a resistência/redução de parasitemia em animais SOCS2 KO infectados pode estar atribuída a alta habilidade de macrófagos de animais deficientes de SOCS2 em matar formas amastigotas intracelulares através do aumento da produção de NO (induzido por IFN- $\gamma$ ), porém, futuros estudos são necessários para entendermos o mecanismo molecular que envolve esse aumento de resistência (Figura 9).



**Figura 9. Efeitos da atividade microbiostática induzida por IFN- $\gamma$  em macrófagos de animais SOCS2 KO infectados com *T. cruzi*.** (A) Níveis de nitrito foram analisados em sobrenadantes de macrófagos infectados com *T. cruzi* e/ou estimulados com IFN- $\gamma$ . Cultura de células não infectadas foram usadas como controle. (B) Macrófagos de animais WT e SOCS2 KO foram infectados com *T. cruzi* e tratados com IFN- $\gamma$  (Tc+IFN- $\gamma$ ), cultivados por 48 horas, lavados, fixados e marcados, e formas amastigotas intracelulares foram contadas em 300 células. Cada ponto representa a média  $\pm$ SD de triplicatas e são representativas de 3 experimentos realizados separadamente. \* $P < 0.05$  comparado com valores obtidos na ausência de parasitas e/ou de citocinas.

# ***Discussão***

O presente estudo relata pela primeira vez importantes contribuições da proteína SOCS2 no modelo experimental da doença de Chagas. Em adição, nós demonstramos que a expressão de SOCS2 induzida por *T. cruzi* é, em parte, dependente da atividade da enzima 5-LO. Diante dessas considerações, 5-LO têm recebido importante atenção em pesquisas com inflamação, relacionadas a infecção com *T. cruzi*, devido ao seu envolvimento na síntese de leucotrienos. Leucotrienos são conhecidos por serem relevantes em controlar infecções por parasitas protozoários como demonstrado em vários estudos (Henderson *et al.*, 1998; Machado *et al.*, 2005). Em adição aos leucotrienos, 5-LO induz a produção de LXA que, por sua vez, engatilha o receptor citoplasmático AhR o qual regula a maioria das ações biológicas das lipoxinas, incluindo o aumento da expressão de SOCS2 (Machado *et al.*, 2006). Nós demonstramos que a deficiência da expressão de SOCS2 claramente resulta na redução da parasitemia no sangue periférico (mas não no parasitismo expresso no coração) e na modulação de citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ . Nossas observações *in vitro* sugerem que a resistência a infecção (replicação do parasita) possa ser atribuída a alta habilidade de macrófagos de animais deficientes de SOCS2 em matarem as formas amastigotas intracelulares através do aumento da produção de NO; porém futuros experimentos são necessários para entendermos os mecanismos moleculares envolvidos nesse aumento de resistência. Nossos estudos *in vivo* demonstraram que o tratamento de animais infectados com *T. cruzi* com aspirina modula a sinalização de citocinas no baço de animais infectados, provavelmente através da produção de lipoxina engatilhada por aspirina (Aspirin-triggered Lipoxin) que, por sua vez, induz a expressão de SOCS2 e a degradação de TRAF-6 (Mukherjee *et al.*, 2011) impedindo uma descontrolada produção de citocinas durante a fase aguda da infecção. Aqui, nós encontramos que durante a infecção por *T. cruzi* a modulação da expressão de SOCS2 é parcialmente dependente de 5-LO e que SOCS2 por sua vez, modula a indução da via 5-

LO/LXA<sub>4</sub>. SOCS2 assim como outros membros desta família regulam a via de sinalização JAK/STAT dependente de citocinas em vários sistemas *in vitro* (Rico-Bautista, Flores-Morales & Fernandez-Perez, 2006). SOCS2 tem sido associado com a regulação do hormônio do crescimento, IGF-1, PRL, IL-2, IL-3, EPO, LIF, EGF, leptina e com vias de sinalização dependentes de IFN- $\gamma$  (Rico-Bautista, Flores-Morales & Fernandez-Perez, 2006).

A resposta intracelular regulada por SOCS tem recebido importante atenção, particularmente porque a deficiência de SOCS1 ou SOCS3 é letal em camundongos (Kile & Alexander, 2001). Desde as primeiras descrições da família de proteínas SOCS tem havido um progresso no entendimento do seu papel na saúde e na doença. Nós mostramos que SOCS2 está envolvido na regulação da resposta imune frente à infecção com *T. gondii* (Machado *et al.*, 2006a; Machado *et al.*, 2006b). Por exemplo, demonstramos que durante a infecção por *T. gondii*, SOCS2 foi induzido em células dendríticas por LXA como resultado da ativação de dois receptores, AhR e LXAR. Além disso, a deficiência de SOCS2 está envolvida na diminuição da proliferação microbiana, infiltração anormal de leucócitos, uma produção descontrolada de citocinas pró-inflamatórias e numa elevada mortalidade (Machado *et al.*, 2006a; Machado *et al.*, 2006b). No presente estudo, nós encontramos que durante a infecção por *T. cruzi* a expressão ubíqua de SOCS2 exerce diferentes ações. De fato, nossos resultados demonstraram que durante a infecção, em adição a redução de citocinas pró-inflamatórias, a deficiência de SOCS2 também resultou em diminuição da expressão de SOCS1 e SOCS3 no baço e no coração. No coração, esta redução pode estar relacionada à alta resposta hipertrófica encontrada em animais SOCS2 infectados quando comparados com animais WT. Em adição, a expressão da citocina inflamatória IL-6 foi igualmente aumentada no coração de animais WT e SOCS2 KO infectados. Os membros da família da citocina IL-6 tem sido relatados estarem envolvidos



na indução de hipertrofia de cardiomiócitos a qual pode ser abolida através da indução de SOCS1 e SOCS3 e subsequente inibição da via MEK5-ERK5 (Takahashi *et al.*, 2005). Juntos, estes resultados sugerem que animais SOCS2 KO infectados com *T. cruzi* desenvolvem hipertrofia cardíaca devido a redução da expressão de SOCS1 e SOCS3 no coração, a qual favorece a contínua ativação de receptores da citocina IL-6.

Outro ponto importante na doença de Chagas, é o remodelamento elétrico cardíaco. Previamente, estudos mostraram que durante a fase aguda da doença de Chagas, a redução na corrente de potássio leva ao remodelamento do potencial de ação (Pacioretty *et al.*, 1995). Aqui, demonstramos pela primeira vez que, durante a fase aguda da doença de Chagas, ocorre uma significativa redução na amplitude da corrente de cálcio tipo L. Interessante que a deficiência de SOCS2 resulta em dramáticas mudanças em todos os parâmetros eletrofisiológicos avaliados nos cardiomiócitos. No passado, foram demonstradas que diferentes citocinas são capazes de modular correntes iônicas em cardiomiócitos isolados (Fernandez-Velasco *et al.*, 2007; Hagiwara *et al.*, 2007). Recentemente, a correlação entre redução da contratilidade celular e o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  durante a infecção com *T. cruzi* foi demonstrada (Roman-Campos *et al.*, 2009). Nossos resultados sugerem que os membros da família da citocina IL-6 também podem estar envolvidos na modulação da eletrofisiologia em cardiomiócitos de camundongos infectados com *T. cruzi*. De fato, LIF, um membro da família de IL-6, é capaz de aumentar  $I_{Ca,L}$  através da ativação da via ERK (Kato *et al.*, 2000). Ainda não é claro como o perfil de citocinas encontradas na ausência de SOCS2 se correlaciona com o remodelamento elétrico dos cardiomiócitos. Entretanto, nossos resultados mostram claramente que a deficiência de SOCS2 leva a uma mudança considerável no manuseio de cálcio intracelular durante a infecção com *T. cruzi*. Interessantemente, nós observamos um aumento intracelular do transiente de cálcio global em cardiomiócitos de animais SOCS2

KO infectados com *T. cruzi* que não é afetado pelo decaimento da corrente de cálcio tipo-L quando comparados com animais WT. Esta discrepância aparente poderia ser explicada pelo prolongamento do potencial de ação observado em cardiomiócitos de animais SOCS2 KO. Porém, outros mecanismos poderiam influenciar no aumento do transiente de  $Ca^{2+}$  no cardiomiócito.

Nossos resultados sugerem que SOCS2 é crítico na modulação da via de sinalização intracelular engatilhada em cardiomiócitos durante a infecção por *T. cruzi*. Em adição, nós encontramos que o desbalanço de SOCS2 pode resultar em uma variação da alteração da resposta imune incluindo a alta produção de LXA<sub>4</sub> e expansão/geração de células Treg e uma significativa redução de células T de memória durante a infecção. O aumento da produção de LXA<sub>4</sub> e do número de células Treg encontrados em animais deficientes de SOCS2 infectados com *T. cruzi* pode estar relacionado com a reduzida geração de resposta Th1 que nós encontramos durante esta infecção. Trabalhos mostram que AhR altera o balanço de células Treg pela modificação do perfil de citocinas (Stevens, Mezrich & Bradfield, 2009) e nós estamos investigando a possibilidade de indução da expressão de SOCS2, pela ativação do receptor AhR, durante a infecção com *T. cruzi* como um modulador da geração/expansão de Treg. Entretanto, o papel de Treg na infecção experimental por *T. cruzi* continua controverso (Tonelli *et al.*, 2011). Existem estudos demonstrando a alta frequência de células Tregs circulantes, com a maioria de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expressando FoxP3 em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas, o que é oposto ao quadro de pacientes com doença cardíaca (Sathler-Avelar *et al.*, 2009). A aumentada frequência de células Treg também foi encontrada durante a fase aguda de infecção experimental por *T. cruzi* em camundongos (Tonelli *et al.*, 2011). Sales *et al.* (Sales *et al.*, 2008) demonstraram que a depleção de células Treg usando anticorpos anti-CD25, não confere resistência a infecção em camundongos. Em adição, os dados

demonstraram que durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, houve uma migração de células Treg para o coração de animais infectados e que tratamento com anti-CD25 resultou em aumento da mortalidade (Mariano *et al.*, 2008). Os resultados conflitantes podem ser, em parte, pelo uso de protocolos distintos, diferentes linhagens de animais e/ou diferenças da cepa do parasita empregado (Mariano *et al.*, 2008). Juntos, esses resultados demonstram que células Treg possuem um importante papel durante a infecção por *T. cruzi* participando do balanço imunobiológico durante esta infecção. Estudos adicionais são necessários para melhor elucidar o papel preciso de células Treg durante a infecção por *T. cruzi*. Entretanto, o aumento de células Treg pode estar diretamente relacionado com redução da resposta Th1 que encontramos em camundongos SOCS2 KO infectados. O balanço entre citocinas tipo 1 que ativam macrófagos a matarem o parasita e citocinas regulatórias do tipo 2 são necessários para promoverem a imunidade e reduzir a patologia no coração de indivíduos infectados com *T. cruzi*. Durante a infecção com esse patógeno, ocorre supressão da imunidade mediada por células T e aumento da apoptose de linfócitos, o que pode contribuir para a persistência do parasita no hospedeiro. Todavia, a supressão da resposta Th1 que encontramos nos camundongos deficientes de SOCS2 pode estar associada com uma exacerbação da resposta Th2. De fato, recentemente foi demonstrado o papel de SOCS2 na modulação da resposta Th2, na qual usando o modelo de asma, Knosp e colaboradores (Knosp *et al.*, 2011) demonstraram que, na ausência de SOCS2, há uma exacerbação da resposta de linfócitos T CD4<sup>+</sup> associado a um aumento de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 que, por sua vez, levam a um aumento de IgE no soro e infiltração de células Th2, eosinófilos e basófilos. Portanto, animais deficientes de SOCS2 são altamente susceptíveis a dermatite atópica, sugerindo um novo papel de SOCS2 em controlar linhagens CD4<sup>+</sup> e respostas alérgicas do tipo 2. Entretanto, o papel de SOCS2 no

desenvolvimento de células Th2 durante a infecção por *T. cruzi* não é conhecido e atualmente estudos relacionados a essa resposta estão em andamento em nosso laboratório.

A resposta Th2 também está diretamente relacionada com a ativação de células B/plasmócitos e produção de anticorpos. Em relação a correlação de anticorpos na progressão da doença de chagas, estudos mostraram que anticorpos anti-*T. cruzi* foram encontrados no soro de indivíduos infectados e a presença desses anticorpos tem sido associada com a infecção, determinando o papel dessas moléculas na dinâmica da doença. Outros estudos demonstraram que soro de pacientes chagásicos são capazes de reagir com alguns epitopos do hospedeiro como receptores beta adrenérgicos, sugerindo um papel importante na mediação da disfunção cardíaca. Outros trabalhos ainda mostraram que níveis de anticorpos contra receptores adrenérgicos e colinérgicos se correlacionam com parâmetros de função autonômica mas não com a gravidade da doença de Chagas.

O envolvimento de anticorpos como mediadores da reatividade celular na doença de Chagas em humanos foi sugerido pela demonstração que anticorpos idiotípicos anti-epimastigotas isolados do soro de pacientes foram capazes de desencadear a proliferação celular *in vitro*. Estudos recentes sugerem que esses anticorpos podem estar envolvidos na imunopatologia da doença de Chagas, representando um constante elemento estimulatório capaz de eliciar respostas celulares. O papel de SOCS2 na ativação de células B/plasmócitos e produção de anticorpos durante a infecção por *T. cruzi* não é conhecido e será investigado durante o meu doutoramento.

Portanto, é crucial a regulação do sistema imune, processo este com múltiplos componentes fundamentais para o bloqueio de eventuais danos que se seguiriam a uma resposta imune efetora contra *T. cruzi* e SOCS2 parece ser essencial nesses processos.

# **Conclusão**

Nossos resultados demonstraram que SOCS2 possui um papel fundamental durante a infecção experimental por *T. cruzi* modulando a geração/expansão de células Th1, Treg e de memória e no controle da função cardíaca. Possivelmente, o papel principal do envolvimento de SOCS2 em cardiomiócitos envolvam a modulação de SOCS1 e SOCS3 e subsequentemente a inibição da estimulação de receptores de IL-6; estas hipóteses estão sendo estudadas no nosso laboratório.

# **Referências**

1. Aliberti, J. C., Cardoso, M.A., Martins, G.A., Gazzinelli, R. T., Vieira, L. Q., Silva, J. S. 1996. Interleukin 12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun* 64:1961-1967.
2. Andrade, S. G., Andrade, Z. A. 1968. Patologia da doença de Chagas experimental de longa duração. *Rev Inst Med Trop* 10:180D-7.
3. Andrews, N. W., Abrams, C. K., Slatin, S. L., Griffiths, G. 1990. A *T.cruzi* secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* 61:1277-87.
4. Araújo, F. G. 1989. Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4+(CD4+) T lymphocytes. *Infect Immun* 57:2246-48.
5. Ashton, A. W., Mukherjee, S., Nagajyothi, F. N., Huang, H., Braunstein V. L., Desruisseaux, M. S., Factor, S. M., Lopez, L., Berman, J. W., Wittner, M., Scherer, P. E., Capra, V., Coffman, T. M., Serhan, C. N., Gotlinger, K., Wu, K. K., Weiss, L. M., Tanowitz, H. B. 2007. Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 204:929-940.
6. Bers, D. M. 2002. Intracellular Na(+) concentration is elevated heart failure but Na/K pump function is unchanged. *Front Biosci* 1;7:d1697-711.
7. Bers, D. M. 2006. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology* 21:380-7.
8. Borges, C. L., Cecchini, R., Tatakihara, V. L., Malvezi, A. D., Yamada-Ogatta, S. F., Rizzo, L. V., Pinge-Filho, P. 2009. 5-Lipoxygenase plays a role in the control of parasite burden and contributes to oxidative damage of erythrocytes in murine Chagas' disease. *Immunol Lett* 123:38-45.
9. Blanchard, M. 1912. Marche de l'infection à *Schizotrypanum cruzi* chez le cobaye et la souris. *Bull Soc Path Exot* 5:598-599.
10. Brener, Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol* 27:347-382.
11. Brock, T. G., Peters-Golden, M. 2007. Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. *Scientific World Journal* 7:1273-1284.



12. Cardillo, F. *et al* 1996. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukine 10: role of NK cells. *Infect Immun* 64:128-134.
13. Chagas, C. 1909. Nova tripanossomiase humana. *Mem Ins Oswaldo Cruz* (Rio de Janeiro) 1:159-218.
14. Chagas, C. 1916. Processos patogênicos da tripanosomiase americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 3:219.
15. Chagas, C. 1934. Estado atual da tripanosomiase americana. *Rev Biol Hyg* 5:58-64.
16. Chambo, J. G., Cabeza, M. P. M., Laguens, R. P. 1990. Presence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in the sera of mice with experimental autoimmune myocarditis. *Experientia* 46:977-9.
17. Coura, J. R., Borges-Pereira, J. 2010. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop* 115(1-2):5-13.
18. Cook-Moreau, J. M., El-Makhour Hojeij, Y., Barri`ere, G., Rabinovitch-Chable, H. C., Faucher, K. S., Sturtz, F. G., Rigaud, M. A. 2007. Expression of 5-lipoxygenase (5-LOX) in T lymphocytes. *Immunol* 122(2): 157-66.
19. Culbertson, J. T., and Kolodny, M. H. 1938. Acquired immunity in rats against *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol* 24:83-90.
20. Da Silva, N. N., Clausell, D. T., Nolibos, H., de Mello, A. L., Ossanay, J., Rapone, T., Snell, T. 1968. Epidemic outbreak of Chagas disease probaly due to oral contamination. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 10(5):265-76.
21. De Meis, J., Morrot, A., Farias-de-Oliveira, D. A., Villa-Verde, D. M. S., Savino, W. 2009. Differential Reginal Immune Response in Chagas Disease. *Plos Negl Trop Dis* 3(7):417.
22. Dias, E. 1934. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (Rio de Janeiro) 28:1-110.

23. Drachman, D. B., Rothstein, J. D. 2000. Inhibition of cyclooxygenase-2 protects motor neurons in an organotypic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 48(5):792-5.
24. Dvorak, J. A., Schmunis, G. A. 1972. *Trypanosoma cruzi*: Interaction with mouse peritoneal macrophages. *Exp Parasitol* 32:289-300.
25. Ferguson, A. D. 2007. Crystal Structure of inhibitor-bound human 5-Lipoxygenase-activating protein. *Science* 317, 510.
26. Fernandez-Velasco, M., Ruiz-Hurtado, G., Hurtado, O., Moro, M. A., Delgado, C. 2007. TNF-alpha downregulates transient outward potassium current in rat ventricular myocytes through iNOS overexpression and oxidant species generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H238-245.
27. Goh, J., Godson, C., Brady, H. R., Macmathuna, P. 2003. Lipoxins: pro-resolution lipid mediators in intestinal inflammation. *Gastroenterology* 124, 1043-1054.
28. Gorelik, G., Borda, E., Postan, M., Gonzáles Cappa, S., Sterin-Borda, L. 1992. T lymphocytes from *T.cruzi* infected mice alter heart contractility: participation of arachidonic acid metabolites. *J Mol Cell Cardiol* 24:9-20.
29. Gutierrez, F. R., Guedes, P. M., Gazzinelli, R. T., Silva, J. S. 2009. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol* 31:673-685.
30. Guatimosim, S., Sobie, E. A., dos Santos Cruz, J., Martin, L. A., Lederer, W. J. 2001. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca(2+) current. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C1327-1339.
31. Hagiwara, Y., Miyoshi, S., Fukuda, K., Nishiyama, N., Ikegami, Y., Tanimoto, K., Murata, M., Takahashi, E., Shimoda, K., Hirano, T., Mitamura, H., Ogawa, S. 2007. SHP2-mediated signaling cascade through gp130 is essential for LIF-dependent I CaL, [Ca2+]i transient, and APD increase in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 43:710-716.
32. Hauschka, T. S., Godwin, N. B., Palmquist, J., Brown, E. 1950. Immunological relationship between seven strains of *Trypanosoma cruzi* and its application in the diagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 30:1-16.

33. Henderson, W. R., Chi Jr, E. Y. 1998. The importance of leukotrienes in mast cell-mediated *Toxoplasma gondii* cytotoxicity. *J Infect Dis* 177:1437-1443
34. Hideko, T. V. L., Cecchini, R., Borges, C. L., Malvezi, A. D., Graça-de Souza, V. K., Yamada-Ogatta, S. F., Rizzo, L. V, Pinge-Filho, P. 2008. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52:47-58.
35. Higuchi Mde, L., Gutierrez, P. S., Aiello, V. D., Palomino, S., Bocchi, E., Kalil, J., Bellotti, G., Pileggi, F. 1993. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 423(3):157-60.
36. Hoare, C. A, Wallace, F G. 1966. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature* 212:1385-1386.
37. Kato, T., Sano, M., Miyoshi, S., Sato, T., Hakuno, D., Ishida, H., Kinoshita-Nakazawa, H., Fukuda, K., Ogawa, S. 2000. Calmodulin kinases II and IV and calcineurin are involved in leukemia inhibitory factor-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circ Res* 87:937-945.
38. Kierszenbaum, F., J. Ivanyi, and D. B. Budzko. 1976. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol* 30:1-6.
39. Kierszenbaum, F., Pienkowski, M. M. 1979. Thymus dependent control of host immune defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 24:117-20.
40. Kile, B. T., Alexander, W. S. 2001. The suppressors of cytokine signalling (SOCS). *Cell Mol Life Sci* 58:1627-1635.
41. Knosp, C. A., Carroll, H. P., Elliott, J., Saunders, S. P., Nel, H. J., Amu, S., Pratt, J. C., Spence, S., Doran, E., Cooke, N., Jackson, R., Swift, J., Fitzgerald, D. C., Heaney, L. G., Fallon, P. G., Kissenpfenning, A., Johnston, J. A. 2001. SOCS2 regulates T helper type 2 differentiation and the generation of type 2 allergic responses. *J Exp Med* 208(7):1523-31.
42. Koberle, F. 1957. Patogenia da moléstia de Chagas: estudo dos órgãos musculares e ocos. *Rev Goiana Med* 3:155-80.

43. Koberle, F. 1968. Chagas' disease and Chagas's syndromes: The pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 6:63-116.
44. Koberle, F. 1974. Pathogenesis of Chagas' Disease, In Ciba Found Symp 20 (new series), Trypanosomiasis and leishmaniasis with special reference to Chagas' disease. *Elsevier Experta Medica North Holland* pp.137-158.
45. Kolodny, M. H. 1940. The effect of environmental temperature upon experimental trypanosomiasis (*T. cruzi*) of rats. *Am J Hyg* 32:21-23.
46. Krettli, A. U., Brener, Z. 1976. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol* 116:755-60.
47. Lang, R.M., Bierig, M., Devereux, R. B., Flachskampf, F. A., Foster, E., Pellikka, P. A., Picard, M. H., Roman, M. J., Seward, J., Shanewise, J., Solomon, S., Spencer, K. T., St John Sutton, M., Stewart, W. 2006. Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiogr* 7:79-108.
48. Laucella, S. A., M. Postan, D. Martin, B. Hubby Fralish, M. C. Albareda, M. G. Alvarez, B. Lococo, G. Barbieri, R. J. Viotti, and R. L. Tarleton. 2004. Frequency of interferon- gamma -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis* 189:909-918.
49. Ley, V., Robbins, E. S., Nussenzweig, V., Andrews, N. W. 1990. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J Exp Med* 171:401-13.
50. Lima-Martins, M. V., Sanchez, G. A., Krettli, A. U., Brener, Z. 1985. Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. *Parasite Immunol* 7:367-76.
51. Machado, E. R., Ueta, M. T., Lourenço, E. V., Aníbal, F. F., Sorgi, C. A., Soares, E. G., Roque-Barreira, M. C., Medeiros, A. I., Faccioli, L. H. 2005. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. *J Immunol* 175:3892-3899
52. Machado, F. S., Martins, G. A., Aliberti, J. C., Mestriner, F. L., Cunha, F. Q., Silva, J. S. 2000. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation* 102:3003-3008.

53. Machado, F. S., Johndrow, J. E., Esper, L., Dias, A., Bafica, A., Serhan, C. N., Aliberti, J. 2006. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS2 dependent. *Nat Med* 12:330-334.
54. Machado, F. S., Aliberti, J. 2006. Impact of lipoxin-mediated regulation on immune response to infectious disease. *Immunol Res* 35:209-218.
55. Magarino Torres, C. 1929. Patogenia de la miocarditis crônica en la enfermedad de Chagas'. Quinta reunião da Sociedade Argentina de Patologia Regional del Norte 2:902-16.
56. Magarino Torres, C. B., Tavares, B. M. 1953. Miocardite no macaco *Cebus* após inoculações repetidas com *Schizotrypanum cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (Rio de Janeiro) 56:85-119.
57. Maria, T. A., Alcantara, A., Brener, Z. 1982. Ultrastructural studies on the *in vitro* interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. *Acta Trop* 39:99-109.
58. Mariano, F. S., Gutierrez, F. R., Pavanelli, W. R., Milanezi, C. M., Cavassani, K. A., Moreira, A. P., Ferreira, B. R., Cunha, F. Q., Cardoso, C. R., Silva, J. S. 2008. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect* 10:825-833.
59. Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C., Simoes, M. V. 2007. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 115(9):1109-23.
60. Maya, J. D., Orellana, M., Ferreira, J., Kemmerling, U., Lopez-Muñoz, R., Morello, A. 2010. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol Res* 43(3):323-31.
61. Mayer, M. R. L. H. 1914. Zum verhalten von *Schizotrypanum cruzi* in wamb lutern und arthropoden. *Ach Schiffs-u Tropen-Hyg* 18:101.
62. Moncayo, A., Ortiz Yanine, M. I. 2006. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol* 100(8):663-77.

63. Moncayo, A., Silveira, A. C. 2009. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin América and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104; 1:17-30.
64. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Coffman, R. L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-55.
65. Mosmann, T. R., Sad, S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17:138-46.
66. Mukherjee, S., Machado, F. S., Huang, H., Oz, H. S., Jelicks, L. A., Prado, C. M., Koba, W., Fine, E. J., Zhao, D., Factor, S. M., Collado, J. E., Weiss, L. M., Tanowitz, H. B., Ashton, A. W. 2011. Aspirin treatment of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and implications for the pathogenesis of Chagas disease, *PLoS One* 6:e16959.
67. Muniz, J., Borriello, A. 1945. Estudo sobre a ação lítica de diferentes soros sobre as formas de cultura e sanguícola do "*Schizotrypanum cruzi*". *Rev Bras Biol* 5:563-67.
68. Nickell, S. P., Boyer, M. H. 1986. *Trypanosoma cruzi*: protective immunization of susceptible strains of mice prone to autoimmunity. *Exp Parasitol* 62:450-52.
69. Norman, L., Kagan, I. G. 1960. Immunologic studies on *Trypanosoma cruzi*. Acquired immunity in mice infected with avirulent American strains of *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* 107:168-74.
70. Pacioretty, L. M., Barr, S. C., Han, W. P., Gilmour, R. F., Jr. 1995. Reduction of the transient outward potassium current in a canine model of Chagas' disease. *Am J Physiol* 268:H1258-1264.
71. Pavanelli, E. R., Gutierrez, F. R., Mariano, F. S., Prado, C. M., Ferreira, B. R., Teixeira, M. M., Canetti, C., Rossi, M. A., Cunha, F. Q., Silva, J. S. 2010. 5-lipoxygenase is a key determinant of acute myocardial inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect* 12(8-9):587-97.
72. Petasis, N. A., Akritopoulou-Zanze, I., Fokin, V. V., Bernasconi, G., Keledjian, R., Yang, R., Uddin, J., Nagulapalli, K. C., Serhan, C. N. 2005. Design, synthesis and bioactions of novel stable mimetics of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids* 73: 301-321.

73. Piessevaux, J., Lavens, D., Montoye, T., Wauman, J., Catteeuw, D., Vandekerckhove, J., Belsham, D., Peelman, F., Tavernier, J. 2006. Functional cross-modulation between SOCS proteins can stimulate cytokine signaling. *J Biol Chem* 281(44):32953-66.
74. Pizzi, T., Prager, R. 1952. Inmunidad a la sobreinfeccion inducida mediante cultivos de *Trypanosoma cruzi* de virulencia atenuada. *Bol Inform Parasitol Chil* 7:20-21.
75. Powell, M. R., Wassom, D. L. 1993. Host genetics and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. I. Antibody isotype profiles. *Parasite Immunol* 15:215-21.
76. Ram, P. A., Waxman, D. J. 1999. SOCS/CIS protein inhibition of growth hormone-stimulated STAT5 signaling by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 274 (50): 35553-61.
77. Rassi, A. 1979. Clínica: fase aguda. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. *Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro 249-64.
78. Rassi Jr. A., Rassi, A., Little, W. C. 2000. Chagas' heart disease. *Clin Cardiol* 23(12):883-9.
79. Reed, S. G., Brownell, C. E., Russo, D. M., Silva, J. S., Grabstein, K. H., Morrissey, P. J. 1994. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 153:3135-3140.
80. Ribeiro-dos-Santos, R., Rossi, M. A. 1985. Imunopatologia. In: J.R.Cançado and M. Chuster- Cardiopatia Chagásica. Belo Horizonte. *Fundação Carlos Chagas* pp.10-22.
81. Rico-Bautista, E., Flores-Morales, A., Fernandez-Perez, L. 2006. Supressor of cytokine signaling (SOCS)2, a protein with multiple functions. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:431-439.
82. Rocha, A., Ferreira, M. S., Nishioka, S. A., Burgarelli, M. K., Almeida, E., Turcato, J. G., Metz, K., and Lopes, E. R. 1994. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 50:261-68.
83. Rocha, M. O. C., Teixeira, M. M., Ribeiro, A. L. 2007. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 5(4):727-43.

84. Rodrigues, A. M., F. Santoro, D. Afchain, H. Bazin, and A. Capron. 1980. *Trypanosoma cruzi*: Infection in B cell deficient rats. *Infect Immun* 80:524.
85. Roman-Campos, D., Duarte, H. L., Sales, P. A., Natali Jr., A. J., Ropert, C., Gazzinelli, R. T., Cruz, J. S. 2009. Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Basic Res Cardiol* 104:238-246.
86. Roman-Campos, D., Campos, A. C., Gioda, C. R., Campos, P. P., Medeiros, M. A., Cruz, J. S. 2009. Cardiac structural changes and electrical remodeling in a thiamine-deficiency model in rats. *Life Sci* 84:817-824.
87. Rubio, M. 1956. Atividade lítica de sueros normales sobre formas de cultivo e sanguíneas de *Trypanosoma cruzi*. *Bol Chil Parasitol* 11:62-69.
88. Ruiz, R. C., Rigoni, V. L., Gonzales, J., Yoshida, N. 1993. The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion. *Parasite Immunol* 15:121-25.
89. Russo, M., Starobinas, N., Minoprio, P., Coutinho, A., Hontebeyrie-Joskowicz. 1988. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi*-infected mice after inactivation of helper T cells. *Annales de l'Institut Pasteur – Immunology (Paris)* 139:225-36.
90. Sales, P. A., Golgher Jr, D., Oliveira, R. V., Vieira, V., Arantes, R. M., Lannes-Vieira, J., Gazzinelli, R. T. 2008. The regulatory CD4+CD25+ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect* 10:680-688.
91. Sathler-Avelar, R., Vitelli-Avelar, D. M., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O. A. 2009. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1:246-251.
92. Silva, J. S., Rossi, M. A. 1990. Intensification of acute *Trypanosoma cruzi* myocarditis in BALB/c mice pretreated with low doses of cyclophosphamide or gamma irradiation. *J Exp Pathol* 71:33-39.
93. Silva, J. S., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Mohler, K. M., Andreson, D., Reed, S. G. 1992. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 175:169-174.



94. Silva, J. S., Vespa, G. N., Cardoso, M. A., Aliberti, J. C., Cunha, F. Q. 1995. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon- activated macrophages. *Infect Immun* 63:4862-4867.
95. Silva, J. S., Machado, F. S., Martins, G. A. 2003. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front Biosci* 8:s314-325.
96. Schaldach, C. M., Riby, J. & Bjeldanes, L. F. 1999. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry* 38:7594-7600.
97. Shimizu, T. 2009. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49:123-50.
98. Schmunis, K. W., Gonzales-Cappa, S. M., Traversa, O. C., Janovsky, J. F. 1971. The effect of immunodepression due to neonatal thymectomy on infection with *Trypanosoma cruzi*. *Trans Rev Soc Trop Med Hyg* 65:89-94.
99. Scott, M. T., M. Goss-Sampson. 1984. Restricted IgG isotype profiles in *T. cruzi* infected mice and Chagas' disease patients. *Clin Exp Immunol* 58:372-7.
100. Starr, R., Hilton, D. J. 1998. SOCS: Supressors of cytokine signalling. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 30:1081-1085.
101. Stevens, E. A., Mezrich, J. D., Bradfield, C. A. 2009. The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology* 127:299-311.
102. Stevenson, N. J., Haan, S., McClurg, A. E., McGrattan, M. J., Armstrong, M. A., Heinrich, P. C., Johnston, J. A. 2004. The chemoattractants, IL-8 and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, regulate granulocyte colony-stimulating factor signaling by inducing suppressor of cytokine signaling-1 expression. *J Immunol* 173(5):3243-9.
103. Takahashi, N., Saito, Y., Kuwahara, K., Harada, M., Tanimoto, K., Nakagawa, Y., Kawakami, R., Nakanishi, M., Yasuno, S., Usami, S., Yoshimura, A., Nakao, K. 2005. Hypertrophic responses to cardiotrophin-1 are not mediated by STAT3, but via a MEK5-ERK5 pathway in cultured cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 38:185-192.

104. Takehara, H. A., Perini, A., Da, S. M. H., and Mota, I. 1981. *Trypanosoma cruzi*: Role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Exp Parasitol* 52:137-46.
105. Talvani, A., Machado, F. S., Santana, G. C., Klein, A., Barcelos, L., Silva, J. S., Teixeira, M. M. 2002. Leukotriene B4 induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. *Infection and Immunity* 8:4247-4253.
106. Tager, A. M., Bromley, S. K., Medoff, B. D., Islam, S. A., Bercury, S. D., Friedrich, E. B., Carafone, A. D., Gerszten, R. E., Luster, A. D. 2003. Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. *Nat Immunol* 4:982-990.
107. Tager, A. M., Luster, A. D. 2003. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69:123-134.
108. Takehara, H. A., Da, S. A. M., Brodskyn, C. I., Mota, I. 1989. A comparative study of anti-*Trypanosoma cruzi* serum obtained in acute and chronic phase of infection in mice. *Immunol Lett* 23:81-85.
109. Tardieux, I., Webster, J., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, J. A., Heuser, J. E., Andrews, N. W. 1992. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* 71:1117-30.
110. Tannahill, G. M., Elliott, J., Barry, A. C., Hibbert, L., Cacalano, N. A., Johnston, J. A. 2005. SOCS2 can enhance interleukin-2 (IL-2) and IL-3 signaling by accelerating SOCS3 degradation. *Mol Cell Biol* 25(20):9115-26.
111. Tarleton, R. L. 1990. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine- induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 144: 717-24.
112. Tonelli, R. R., Torrecilhas, A. C., Jacysyn, J. F., Juliano, M. A., Colli, W., Alves, M. J. 2011. In vivo infection by *Trypanosoma cruzi*: the conserved FLY domain of the gp85/trans-sialidase family potentiates host infection. *Parasitology* 138:481-492.
113. Torrico, F. H. *et al* 1991. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* 146:3626-3632.

114. Viana, G. 1911. Contribuição para o estudo da anatomia patológica na moléstia de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 3:276-94.
115. Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T., Ohtsuka, S., Imaizumi, T., Matsuda, T., Ihle, J. N., Yoshimura, A. 1999. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO* 18(5):1309-20.
116. Yokomizo, T., Kato, K., Terawaki, K., Izumi, T., Shimizu, T. 2000. A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J Exp Med* 192(3):421-432.
117. Warren, L. G., Borsos, T. 1959. Studies on immune factors occurring in sera of chickens against the crithidia stage of *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 82:585-90.