

Claudiney Melquíades Rodrigues

Análise multifatorial de mecanismos patogénéticos implicados na  
infecção por *Trypanosoma cruzi* em camundongos BALB/c

Belo Horizonte  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2010

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Análise multifatorial de mecanismos patogénéticos implicados na  
infecção por *Trypanosoma cruzi* em camundongos BALB/c

Claudiney Melquíades Rodrigues

Orientadora: Profª. Dra. Andréa Mara Macedo

Belo Horizonte  
2010

Claudiney Melquíades Rodrigues

Análise multifatorial de mecanismos patogénéticos implicados na  
infecção por *Trypanosoma cruzi* em camundongos BALB/c

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e  
Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito  
parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica e  
Imunologia.

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Mara Macedo

Belo Horizonte  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2010

Rodrigues, Claudiney Melquíades  
Análise multifatorial de mecanismos patogênicos implicados na infecção  
por *Trypanosoma cruzi* em camundongos BALB/c. [manuscrito]  
/ Claudiney Melquíades Rodrigues. Belo Horizonte, 2010  
145 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Andréa Mara Macedo

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento  
de Bioquímica e Imunologia.

1. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 2. Chagas, Doença de - Patogênese - Teses.  
3. Biologia molecular - Teses. 4. Bioquímica - Teses. I. Macedo, Andréa  
Mara. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de  
Bioquímica e Imunologia. III. Título.

CDU: 616.937



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE CLAUDINEY MELQUIADES RODRIGUES.** Aos dezenove dias do mês de outubro de 2010 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Análise multifatorial de mecanismos patogênicos implicados na infecção por *Trypanosoma cruzi*, em camundongos BALB/c", requisito final para a obtenção do grau de *Doutor em Ciências: Biologia Molecular*. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Andréa Mara Macedo, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Eliane Lages Silva, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, aprovado; Dr. Wendell Sérgio Ferreira Meira, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Dra. Luciana de Oliveira Andrade, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dra. Fabiana Simão Machado, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dra. Andréa Mara Macedo, orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado. Pelas indicações, o candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 19 de outubro de 2010.

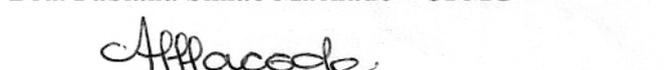


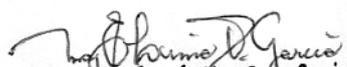
Dra. Eliane Lages Silva - UFTM

  
Dr. Wendell Sérgio Ferreira Meira - UFTM

  
Dra. Luciana de Oliveira Andrade - UFMG

  
Dra. Fabiana Simão Machado - UFMG

  
Dra. Andrea Mara Macedo - orientadora - UFMG

  
Prof. Maria Elena de Lima Perez Garcia  
Coordenadora do Curso de Pós Graduação  
em Bioquímica e Imunologia  
ICB - UFMG

*“...the improvement of health is likely to come in the future, as in the past, from modification of the conditions which lead to disease, rather than from intervention in the mechanism of disease after it has occurred.”*

*Thomas McKeow*

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Bioquímica do Depto. de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais sob a orientação da *Profa. Dra. Andréa Mara Macedo* em colaboração com os seguintes pesquisadores:

*Profa. Dra. Ana Maria Caetano de Faria*, Laboratório de Imunobiologia, Depto. de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG;

*Dra. Andréa Teixeira de Carvalho*, Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ;

*Prof. Dr. Égler Chiari*, Laboratório de Biologia do *Trypanosoma cruzi*, Depto. de Parasitologia/ICB/UFMG;

*Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo*, Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ;

*Dr. Olindo Assis Martins Filho*, Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ;

*Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes*, Laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental, Depto. de Patologia Geral/ICB/UFMG.

Apoio financeiro: Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Dedico esse trabalho à minha mãe, *Margarida Melquíades Barbosa*, pelo carinho, dedicação, incentivo e fundamental apoio durante a realização desse trabalho.

### *Agradecimentos*

À minha orientadora, *Profa. Dra. Andréa Mara Macedo*, pela agradável convivência, confiança e oportunidade de realizar esse trabalho;

À *Profa. Dra. Ana Maria Caetano de Faria* por toda ajuda durante o planejamento dos experimentos e pela indispensável contribuição no preparo do manuscrito para publicação;

À *Dra. Andréa Teixeira de Carvalho* pela agradável convivência e ajuda tanto no planejamento dos experimentos quanto na sua execução, principalmente nas análises por citometria de fluxo, bem como no preparo do manuscrito para publicação;

Ao *Prof. Dr. Égler Chiari* por ter nos fornecido as populações de *T. cruz* usadas nos experimentos, pela ajuda durante as infecções e sacrifício dos animais para obtenção das amostras biológicas;

Ao *Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo* pela agradável convivência e toda ajuda na manutenção das populações de *T. cruzi* usadas nos experimentos, infecção dos animais e análises por citometria de fluxo, bem como no preparo do manuscrito para publicação;

Ao *Dr. Olindo Assis Martins Filho* pela disposição em colaborar conosco nesse trabalho, pela fundamental ajuda no planejamento dos experimentos e nas análises por citometria fluxo, bem como no preparo do manuscrito para publicação;

À *Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes* pela ajuda nas análises histopatológicas e durante a preparação do manuscrito para publicação;

Ao *Dr. Helder Magno Silva Valadares* pela agradável convivência e essencial ajuda, principalmente nas análises moleculares e redação tanto desse manuscrito quanto do artigo para publicação;

Ao Pós-Graduando *Alan Ferreira Aguiar* pela amizade e crucial ajuda durante a escolha dos iniciadores usados na genotipagem das populações de *Trypanosoma cruzi* em amostras de tecido cardíaco por LSSP-PCR.

Às Pós-Graduandas *Jerusa Marilda Arantes* e *Amanda Fortes Francisco* pela agradável convivência e fundamental ajuda, principalmente nas análises por citometria de fluxo e preparo do manuscrito para publicação;

A todos do apoio técnico por manterem a organização do ambiente de trabalho, em especial à *Téc. Neuza Antunes Rodrigues* pela agradável convivência e essencial ajuda durante a obtenção das amostras biológicas, bem como por sua preocupação com a segurança de todos no ambiente de trabalho;

Aos demais professores do Laboratório de Genética Bioquímica: *Prof. Dr. Carlos Renato Machado*, *Profa. Dra. Glória Regina Franco* e *Prof. Dr. Sérgio Pena* pela agradável convivência e indispensável contribuição durante a realização desse trabalho;

A todos os pesquisadores que se dedicam ao estudo da doença de Chagas, cujos trabalhos científicos serviram de embasamento para a redação desse trabalho e uma melhor compreensão da complexidade da doença.

Aos colegas do LGB pela agradável convivência e indispensável ajuda durante a realização desse trabalho;

A todos do Laboratório de Imunologia/CPqRR/FIOCRUZ, em especial à *Tiza*, por toda a ajuda nas análises por citometria de fluxo;

À UFMG, à Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia e a todos os professores que contribuíram para minha formação;

Aos colegas da Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia pela agradável convivência;

À *Celise* por toda assistência e paciência dispensadas durante o curso;

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

## Resumo

Um século após a descoberta do *Trypanosoma cruzi*, muitas incertezas em relação aos fatores determinantes na patogênese da doença de Chagas ainda persistem. No presente trabalho, os efeitos da associação de duas populações de *T. cruzi* com virulência e patogenicidade opostas em camundongos *BALB/c* foram investigados através da análise simultânea de múltiplos parâmetros biológicos durante a fase aguda da infecção. Para isso, os animais foram infectados com 100 tripomastigotas de *JG* ou *CL Brener* ou coinfectados com 50 tripomastigotas de cada uma das respectivas populações de *T. cruzi* por via i.p. Os efeitos sistêmicos da doença foram avaliados através da análise da evolução da parasitemia, massa corporal e sobrevivência durante a fase aguda da infecção. Alternativamente, os animais foram sacrificados em 7, 14 e 21 dias após a infecção para a análise simultânea de múltiplos parâmetros biológicos. Camundongos infectados apenas com *JG* apresentaram parasitemia e parasitismo cardíaco reduzidos, níveis séricos de mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , CCL2, IL-6 e IFN- $\gamma$ ) similares àqueles encontrados entre animais normais, nenhuma manifestação clínica de toxemia e mortalidade nula. Por outro lado, animais infectados apenas com *CL Brener* apresentaram parasitemia e parasitismo cardíaco elevados, bem como um aumento na liberação sistêmica de mediadores pró-inflamatórios e alta taxa de mortalidade provavelmente devida a uma resposta inflamatória sistêmica semelhante ao choque tóxico. Interessantemente, a coinfecção com *JG* e *CL Brener* resultou em níveis de parasitemia, parasitismo cardíaco e taxa de mortalidade intermediários em relação a camundongos *BALB/c* infectados apenas com *JG* ou *CL Brener*. Isso foi acompanhado por um aumento significativo na liberação sistêmica de IL-10, o que sugere que a produção endógena dessa importante citocina reguladora possa ser crucial para contrabalancear os efeitos patológicos potencialmente letais deflagrados pela liberação concomitante de mediadores pró-inflamatórios induzidos pela infecção com *CL Brener*. Em conclusão, nossos resultados sugerem que a complexidade clonal da população de *T. cruzi* infectante representa um papel importante na resposta do hospedeiro à infecção e evolução clínica da doença em camundongos *BALB/c* infectados experimentalmente. A combinação de *JG* e *CL Brener* foi capaz de induzir tanto imunidade protetora quanto mecanismos reguladores que aparentemente foram suficientes para atenuar danos patológicos causados pela inflamação em camundongos *BALB/c*.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas.

### *Abstract*

A century after the discovery of the *Trypanosoma cruzi*, many uncertainties remain with respect to factors determining the pathogenesis of Chagas disease. In the present work, the effects of the association of two *T. cruzi* populations with opposite virulence and pathogenicity in *BALB/c* mice were investigated through of the simultaneous analyses of multiple biological parameters during the acute phase of infection. For this, the animals were infected with 100 trypomastigotes of *JG* or *CL Brener* or coinfecting with 50 trypomastigotes of each one of the respective *T. cruzi* populations by i.p. route. The systemic effects of the disease were assessed through analyses of the parasitemia, body weight and survival during the acute phase of infection. Alternatively, the animals were sacrificed at 7, 14 and 21 days post infection (p.i.) for simultaneous analyses of multiple biological parameters. *JG* single infected mice presented reduced parasitemia and heart parasitism, serum levels of pro-inflammatory mediators (TNF- $\alpha$ , CCL2, IL-6 and IFN- $\gamma$ ) similar to those found among naïve animals, none clinical manifestations of toxemia and null mortality. On the other hand, *CL Brener* single infected mice presented higher parasitemia and heart parasitism, as well as an increased systemic release of pro-inflammatory mediators and higher mortality probably due to a toxic shock-like systemic inflammatory response. Interesting, coinfection with *JG* and *CL Brener* strains resulted in intermediate parasitemia, heart parasitism and mortality in relation to *BALB/c* mice single infected with *JG* or *CL Brener*. This was accompanied by a significant increase in the systemic release of IL-10, what suggest that the endogenous production of this important regulatory cytokine can be crucial for counterbalance the potentially lethal pathological effects triggered by concomitant release of pro-inflammatory mediators induced by *CL Brener* infection. In conclusion, our results suggest that the clonal complexity of the infecting *T. cruzi* population plays an important role in the host response to infection and clinical evolution of the disease in experimentally infected *BALB/c* mice. The combination of *JG* and *CL Brener* was able to induce both protective immunity and regulatory mechanisms that seemingly were sufficient to attenuate pathological damages caused by inflammation in *BALB/c* mice.

**Key-words:** *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease.

*Lista de Abreviaturas*

Ab (*antibody*): Anticorpo

ATP: Trifosfato de adenosina

BFA: Brefeldina A

BSA (*Bovine serum albumin*): Albumina sérica bovina

CBA (*Cytometric bead array*): Arranjo de esferas citométricas

CD (*Cluster of differentiation*): Grupamento de diferenciação

CLR (*C-type lectin receptor*): Receptor lectina tipo C

COII (*Cytochrome oxidase subunit II*): Subunidade II da citocromo oxidase

DAF (*Decay-accelerating factor*): Fator acelerador de decaimento

DAMP (*danger-associated molecular pattern*): Padrão molecular associado ao perigo

DC: Doença de Chagas

DNA (*Deoxyribonucleic acid*): Ácido desoxirribonucléico

EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*): Ácido etilenodiaminotetracético

FACS (*Fluorescence-activated cell sorter*): Separador de células ativado por fluorescência

FL1 (*Fluorescence 1*): Canal de fluorescência 1 (FITC)

FL2 (*Fluorescence 2*): Canal de fluorescência 2 (PE)

FL3 (*Fluorescence 3*): Canal de fluorescência 3 (PerCP)

FITC (*Fluorescein isothiocyanate*): Isotiocianato de fluoresceína

FSC (*forward scatter*): Dispersão frontal (relacionada ao tamanho celular)

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

GIPL: Glicoinositolfosfolípido

H&E: Hematoxilina & Eosina

HEV (*High endothelial venule*): Vênula de endotélio alto

HMGB-1 (*high-mobility group box-1 protein*): proteína de alta mobilidade do grupo 1

HSPs (*Heat shock proteins*): Proteínas de choque tóxico

IFN- $\gamma$  (*Interferon gamma*): Interferon gama

Ig (*Immunoglobulin*): Imunoglobulina

I $\kappa$ -B (*inhibitory  $\kappa$ -B*): inibidor do NF- $\kappa$ B

IL (*Interleukin*): Interleucina

IMF: Intensidade Média de Fluorescência

i.p.: intraperitoneal

iNOS (*inducible NO synthase*): NO sintase induzível

kDNA (*kinetoplast DNA*): DNA do cinetoplasto

LSSP-PCR (*Low stringency single prime-polymerase chain reaction*)

LIT (*Liver Infusion Tryptose*): Meio de cultura para *T. cruzi* (epimastigotas)

LPS (*Lipopolysaccharide*): Lipopolissacarídeo

LT: (*leukotriene*): leucotrieno

LT- $\alpha$  (*Lymphotoxin-alpha*): Linfotoxina-alfa

mAb (*monoclonal antibody*): Anticorpo monoclonal

MIF (*macrophage migratory inhibitory factor*); fator inibidor da migração de macrófagos

MFF (*Facs fix solution*): Solução fixadora

MHC (*Major histocompatibility complex*): Complexo principal de histocompatibilidade

M $\phi$ : Macrófago

NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ -B*): fator nuclear  $\kappa$ -B

NOD (*nucleotide-binding oligomerization-domain protein*)

NLR (*NOD-like receptor*): Receptor semelhantes a NOD

NO (*Nitric oxide*): Óxido nítrico

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (*Nitrite*): Nitrito

$\text{NO}_3^-$  (*Nitrate*): Nitrato

NK (*Natural killer cell*): Célula matadora natural

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAMP (*Pathogen associated molecular pattern*): Padrão molecular associado a patógeno

PAF (*platelet-activating factor*): fator ativador de plaquetas

pb: par de base

PBS (*Phosphate Buffered Saline*): Salina tamponada com fosfato

PBS-P: Salina tamponada com fosfato e suplementada com saponina

PBS-W: Salina tamponada com fosfato e suplementada com BSA

PCR (*Polymerase chain reaction*): Reação em cadeia da polimerase

PE (*Phycoerithrin*): Ficoeritrina

PerCP (*Peridinin chlorophyll-alpha protein*): Proteína clorofila-alfa peridinina

PG (*prostaglandin*): prostaglandina

PGI (*prostacyclin*): prostaciclina

pH: Potencial hidrogeniônico

PMN (*Polymorphonuclear*): Leucócito polimorfonuclear

PRR (*Pattern recognition receptor*): Receptor de reconhecimento de padrão

RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*): Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

RPMI: Meio de cultura contendo sais minerais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular.

SFB (*Fetal bovine serum*): Soro fetal bovino

SSC (*side scatter*): Dispersão lateral (relacionada à granulosidade celular)

Tc (*T cytotoxic*): Linfócito T citotóxico

Tc1: Linfócito T citotóxico com perfil de expressão de citocinas do tipo 1

Th (*T helper*): Linfócito T auxiliar

Th1: Linfócitos T auxiliares com perfil de expressão de citocinas do tipo 1

Th2: Linfócitos T auxiliares com perfil de expressão de citocinas do tipo 2

TLR (*Toll like receptor*): Receptor semelhante a *Toll*

TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor alpha*): Fator de necrose tumoral alfa

Treg (*T regulatory cell*): célula T reguladora

TXA (*thromboxane*): tromboxano

UV: Ultravioleta

WHO (*World Health Organization*): Organização Mundial da Saúde

*Lista de tabelas*

TABELA 1	Nomenclatura padronizada de populações de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	11
TABELA 2	Genotipagem das populações de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	43
TABELA 3	Sequências dos iniciadores usados nas reações de PCR.....	54
TABELA 4	Intensidade relativa de fluorescência das populações de esferas cobertas com anticorpos monoclonais de captura.....	63
TABELA 5	Anticorpos monoclonais usados para avaliar o perfil de expressão de citocinas por populações de células esplênicas.....	68
TABELA 6	Combinações de anticorpos monoclonais usados para avaliar o perfil de expressão de citocinas por populações de células MAC-3 <sup>+</sup> , NK CD49b <sup>+</sup> , T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> esplênicas.....	71
TABELA 7	Concentração de hemoglobina, valor hematócrito e concentração de hemácias em 21 dias após a infecção.....	81
TABELA 8	Definições importantes no contexto da sepse.....	113
TABELA 9	Principais mediadores pró- e anti-inflamatórios envolvidos na sepse.....	115

*Lista de figuras*

FIGURA 1	Principais rotas de migração de latino-americanos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	3
FIGURA 2	Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	7
FIGURA 3	Evolução clínica da doença de Chagas.....	14
FIGURA 4	Agonistas de TLRs derivados de <i>Trypanosoma cruzi</i> são capazes de ativar vias de sinalização intracelulares que levam à produção de citocinas pró-inflamatórias por células da imunidade inata do hospedeiro.....	26
FIGURA 5	Imunidade inata durante a fase aguda inicial da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	30
FIGURA 6	Imunidades inata e adaptativa durante a fase aguda da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	35
FIGURA 7	Infecções experimentais.....	45
FIGURA 8	Eletrofluorogramas obtidos a partir da análise de misturas artificiais de DNA total extraído de formas epimastigotas de <i>JG</i> e <i>CL Brener</i> .....	57
FIGURA 9	Diluição seriada de padrões de proteínas recombinantes para a construção de curvas padrão.....	59
FIGURA 10	Resumo do protocolo experimental da técnica CBA.....	61
FIGURA 11	Princípio da técnica CBA.....	62
FIGURA 12	Exemplos de dados obtidos através da análise de padrões com concentrações conhecidas de citocinas pela técnica CBA.....	64
FIGURA 13	Curvas padrão obtidas com o <i>kit mouse inflammation</i> .....	65
FIGURA 14	Análise da expressão intracelular de citocinas por células esplênicas MAC-3 <sup>+</sup> por citometria de fluxo.....	72
FIGURA 15	Análise da expressão do marcador de ativação CD69 e citocinas por células NK esplênicas por citometria de fluxo.....	73
FIGURA 16	Análise da expressão do marcador de ativação CD69 e citocinas por células T esplênicas por citometria de fluxo.....	74
GRÁFICO 1	Avaliação da parasitemia, massa corporal e sobrevivência em camundongos BALB/c infectados com <i>JG</i> e/ou <i>CL Brener</i> durante a fase aguda da infecção.....	79

GRÁFICO 2	Contagem global e diferencial de leucócitos de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener durante a fase aguda da infecção.....	80
FIGURA 17	Análise histopatológica de amostras de tecido cardíaco obtidas de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener em 7 dias após a infecção.....	84
FIGURA 18	Análise histopatológica de amostras de tecido cardíaco obtidas de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener em 14 dias após a infecção.....	85
FIGURA 19	Análise histopatológica (qualitativa e quantitativa) e avaliação do parasitismo em amostras de tecido cardíaco obtidas de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener em 21 dias após a infecção.....	86
FIGURA 20	Detecção do parasito em amostras de tecido cardíaco obtidas de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener em 7, 14 e 21 dias após a infecção.....	89
FIGURA 21	Eletrofluorogramas obtidos a partir da análise de fragmentos amplificados por PCR do loco de microssatélite <i>TcAAAT6</i> em amostras de tecido cardíaco obtidas de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener.....	90
FIGURA 22	Eletrofluorogramas obtidos a partir da análise de fragmentos amplificados por LSSP-PCR em amostras de tecido cardíaco obtidas de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener.....	91
GRÁFICO 3	Avaliação dos níveis de citocinas séricas em camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener em 7, 14 e 21 dias após a infecção....	94
GRÁFICO 4	Relação TNF- $\alpha$ /IL-10, CCL2/IL-10, IFN- $\gamma$ /IL-10 e IL-6/IL-10 em 7, 14 e 21 dias após a infecção.....	95
GRÁFICO 5	Avaliação da massa de baço e número total de células esplênicas/baço em 7, 14 e 21 dias após a infecção em camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener.....	97
GRÁFICO 6	Análise do perfil de expressão de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10 por células esplênicas MAC-3 <sup>+</sup> provenientes de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener.....	100
GRÁFICO 7	Análise do perfil de expressão de CD69, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ por células NK	

	esplênicas provenientes de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener.....	101
GRÁFICO 8	Análise do perfil de expressão de CD69, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e IL-10 por células T CD4 <sup>+</sup> esplênicas provenientes de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener.....	102
GRÁFICO 9	Análise do perfil de expressão de CD69, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e IL-10 por células T CD8 <sup>+</sup> esplênicas provenientes de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener.....	103

## Sumário

<i>I</i>	<i>INTRODUÇÃO</i> .....	1
I.1	O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	1
I.2	Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
I.3	Variabilidade genética em <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	8
I.4	Patogênese da doença de Chagas.....	12
I.4.1	Papel da variabilidade genética do parasito na patogênese da doença de Chagas.....	15
I.4.2	Papel da variabilidade genética do hospedeiro na patogênese da doença de Chagas.....	18
I.5	Resposta imune no contexto da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	24
I.5.1	Imunidade inata na infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	24
I.5.2	Imunidade adaptativa na infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	34
<i>II</i>	<i>JUSTIFICATIVA</i> .....	39
<i>III</i>	<i>OBJETIVOS</i> .....	41
III.1	Objetivo geral.....	41
III.2	Objetivos específicos.....	41
<i>IV</i>	<i>METODOLOGIA</i> .....	42
IV.1	Linhagens de camundongos.....	42
IV.2	Populações de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	42
IV.3	Infecções experimentais.....	44
IV.4	Avaliação da evolução da parasitemia, massa corporal e sobrevivência.....	44
IV.5	Avaliação de parâmetros hematológicos.....	46
IV.6	Análise histopatológica (tecido cardíaco).....	47
IV.6.1	Técnica de coloração por hematoxilina & eosina.....	48
IV.6.2	Análise quantitativa do infiltrado inflamatório cardíaco.....	48
IV.7	Detecção e genotipagem do parasito por PCR em amostras de tecido cardíaco.....	49
IV.7.1	Extração de DNA total de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	50

IV.7.2	Extração de DNA total de amostras de tecido cardíaco.....	50
IV.7.3	Amplificação de fragmentos de ~330 pb da região polimórfica de moléculas de minicírculos do kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	51
IV.7.4	Avaliação da proporção relativa de JG e CL Brener em amostras de tecido cardíaco através da genotipagem do loco de microssatélite <i>TcAAAT6</i> .....	52
IV.7.5	Purificação do fragmento com ~330 pb.....	53
IV.7.6	Avaliação da proporção relativa de JG e CL Brener em amostras de tecido cardíaco por LSSP-PCR.....	53
IV.7.7	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	55
IV.7.8	Determinação do tamanho dos fragmentos obtidos por PCR.....	55
IV.8	Análise quantitativa de citocinas séricas.....	56
IV.8.1	Procedimentos da técnica CBA.....	58
IV.8.2	Aquisição e análise dos dados de CBA.....	60
IV.9	Dosagem de óxido nítrico sérico.....	66
IV.10	Avaliação do perfil de expressão de citocinas por células esplênicas.....	67
IV.10.1	Estratégia de análise de células MAC-3 <sup>+</sup> .....	70
IV.10.2	Estratégia de análise de células NK, T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> .....	70
IV.11	Análise estatística.....	75
<i>V</i>	<i>RESULTADOS</i> .....	76
V.1	Evolução da parasitemia, massa corporal e sobrevivência.....	76
V.2	Avaliação de parâmetros hematológicos.....	77
V.3	Análise histopatológica e morfométrica (tecido cardíaco).....	82
V.4	Detecção do parasito e avaliação da proporção relativa de JG e CL Brener em amostras de tecido cardíaco.....	87
V.5	Análise quantitativa de citocinas séricas.....	88
V.6	Avaliação do perfil de expressão de citocinas por células esplênicas.....	96
<i>VI</i>	<i>DISCUSSÃO</i> .....	104
<i>VII</i>	<i>CONCLUSÕES</i> .....	121
<i>VIII</i>	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....	122

## I. INTRODUÇÃO

### I.1. O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana, descoberta por Carlos Chagas em 1909, tem como agente etiológico o *T. cruzi*, um hematozoário flagelado pertencente à ordem *Kinetoplastida* e à família *Trypanosomatidae* (CHAGAS, 1909). Como todas as outras doenças tropicais negligenciadas, a DC está fortemente associada à pobreza e contribui significativamente para o seu agravamento, principalmente devido à invalidez permanente e mortalidade precoce de indivíduos acometidos pela doença na faixa etária mais produtiva da vida, entre 20 a 59 anos. Além disso, condições precárias de sobrevivência restringem tanto o acesso a serviços de saúde, para o diagnóstico precoce e tratamento da doença, quanto à alimentação saudável, o que compromete a recuperação e o retorno ao trabalho de indivíduos acometidos pela doença. Portanto, DC e pobreza agravam-se mutuamente impedindo os indivíduos acometidos pela doença de alcançarem todo o seu potencial. A manutenção desse ciclo vicioso entre doença e pobreza contribui para a perpetuação de condições precárias de sobrevivência e subdesenvolvimento em vários países da América Latina (FRANCO-PAREDES *et al.*, 2007). Apesar de mais de um século de intensa investigação científica, a DC ainda representa um grave problema de saúde pública na América Latina e é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) entre as principais doenças tropicais negligenciadas no mundo (WHO, 2007).

Na natureza, têm sido encontradas mais de 130 espécies de triatomíneos da família *reduviidae* e mais de 100 espécies de mamíferos infectados com *T. cruzi*. Previamente, a infecção por *T. cruzi* existia como uma enzootia silvestre, mas transformou-se numa antropozoonose a partir do momento em que humanos invadiram ecótopos silvestres e

construíram habitações precárias que permitiram a instalação de triatomíneos hematófagos infectados com o parasito, o que levou ao estabelecimento do ciclo doméstico de transmissão. Atualmente, são distinguidos três ciclos de transmissão do parasito: o ciclo silvestre é enzoótico e envolve triatomíneos e mamíferos selvagens; o ciclo doméstico é mantido por triatomíneos domiciliados que transmitem *T. cruzi* de animais domésticos para seres humanos e entre humanos. O ciclo peridoméstico originou-se do ciclo silvestre e é mantido por triatomíneos e animais peridomiciliados. A conexão entre os três ciclos de transmissão é feita por mamíferos (camundongos, morcegos e gambás) e triatomíneos (*Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *T. sordida* e *T. pseudomaculata*) infectados com *T. cruzi* ou por animais domésticos (cães e gatos) infectados durante caçadas (COURA & DIAS, 2009).

A presença de triatomíneos infectados com *T. cruzi* e potencialmente capazes de transmitir o parasito para seres humanos abrange uma ampla área geográfica no continente Americano, o que coloca milhões de pessoas em risco de infecção. Estimativas recentes sugerem que existam entre 10 a 13 milhões de indivíduos infectados com *T. cruzi*. No Brasil, é estimado em 2,5 milhões o número de indivíduos infectados e a prevalência da DC vem caído significativamente nas últimas décadas, o que se deve principalmente ao controle da transmissão vetorial e à manutenção da triagem de doadores em bancos de sangue. Entretanto, apesar da significativa redução de casos novos e na mortalidade devido à DC nas últimas décadas, ~90 milhões de indivíduos ainda permanecem em risco de infecção por *T. cruzi* na América Latina (MAGUIRE, 2006; COURA, 2007; DIAS, 2007; WHO, 2007; COURA & DIAS, 2009). Além disso, a globalização da DC representa um importante problema de saúde pública em vários países europeus, bem como nos Estados Unidos da América, Canadá, Austrália e Japão (FIG. 1) devido à intensa imigração de indivíduos latino-americanos infectados com *T. cruzi* para esses países (DIAS, 2000; 2007; SCHMUNIS, 2007; ALLAIN *et al.*, 2009; SCHMUNIS & YADON, 2009; COURA & VIÑAS, 2010).

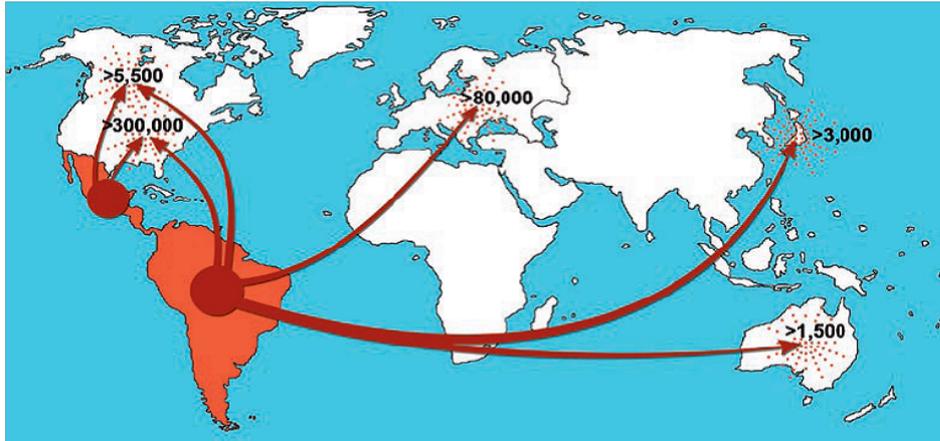


FIGURA 1 - Principais rotas de migração de latino-americanos infectados com *Trypanosoma cruzi*. Europa, Estados Unidos da América, Canadá, Austrália e Japão estão entre as principais rotas de migração de latino-americanos infectados com *T. cruzi*. A estimativa do número total de pessoas infectadas com o parasito nas respectivas regiões também é mostrado (COURA & VIÑAS, 2010).

Vários fatores limitantes, relacionados à complexa história natural da DC, tais como: o complexo ciclo de vida e a existência de múltiplos mecanismos de transmissão do parasito, a manutenção de condições precárias de sobrevivência de populações em risco de infecção, a falta de vacina anti-*T. cruzi*, bem como a escassez ou ausência de sinais e sintomas característicos na fase aguda, representam um enorme obstáculo à erradicação da doença. Além disso, é importante ressaltar que as drogas disponíveis para o tratamento de indivíduos infectados, *benzonidazol* (Roche Pharmaceuticals) e *nifurtimox* (Bayer Health Care), devem ser administradas por longos períodos de tempo, apresentam graves efeitos colaterais e eficácia variável (PUNUKOLLU *et al.*, 2007; TARLETON *et al.*, 2007). Dados recentes demonstram que globalmente a DC está associada com ~14.000 mortes por ano e perdas estimadas em ~700 mil anos de vida devido à invalidez permanente e mortalidade precoce, o que a torna a sexta mais importante doença tropical negligenciada no mundo (HOTEZ *et al.*, 2006). Entre os principais desafios em relação ao controle da doença estão: a manutenção e ampliação de programas relacionados ao controle da transmissão vetorial, o investimento pesado em programas habitacionais, a garantia de acesso rápido a serviços de saúde com eficientes, a manutenção e expansão de programas de triagem em bancos de sangue e o tratamento adequado de indivíduos infectados (FRANCO-PAREDES *et al.*, 2007).

## I.2. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

A espécie *T. cruzi* surgiu há cerca de 150 milhões de anos, originalmente infectando mamíferos primitivos dispersos através da Laurásia e Gondwana, regiões que originaram as Américas do Norte e Sul, respectivamente (BRIONES *et al.*, 1999). Estima-se que o primeiro contato entre *Homo sapiens* e o parasito tenha ocorrido há cerca de 15.000 - 20.000 anos, quando os primeiros humanos ocuparam as Américas. Portanto, *H. sapiens* é um hospedeiro

evolutivamente muito recente para o *T. cruzi*, o que tem sido atestado através da detecção de DNA do parasito em múmias com cerca de 9.000 anos encontradas no norte do Chile e sul do Peru (AUFDERHEIDE *et al.*, 2004; ARAUJO *et al.*, 2009). Em vários países da América Latina a transmissão vetorial de *T. cruzi* ainda representa uma das principais vias de transmissão do parasito. Estima-se que no Brasil existam ~52 de espécies de triatomínios hematófagos potencialmente capazes de transmitir o parasito, mas apenas quatro espécies apresentam importância médica: *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. sórdida* e *T. pseudomaculata*. As outras 47 espécies de triatomínios são estritamente selvagens e estão envolvidas no ciclo silvestre de transmissão do parasito (COURA & DIAS, 2009).

A transmissão do parasito para seres humanos ocorre após o contato com formas tripomastigotas metacíclicas infectantes presentes nas dejeções liberadas, durante o repasto sanguíneo, próximo ao local da picada por triatomínios infectados com *T. cruzi*. As formas tripomastigotas metacíclicas precisam de soluções de continuidade (mucosas intactas e/ou lesões na pele) para infectar o hospedeiro. Após a infecção, as formas tripomastigotas penetram em vários tipos de células do hospedeiro. Intracelularmente, os parasitos escapam do vacúolo parasitóforo e diferenciam-se em formas amastigotas, que se reproduzem assexuadamente por fissão binária no citoplasma celular, o que pode levar à degeneração e morte tanto da célula hospedeira quanto dos parasitos. Alternativamente, o ciclo de vida do parasito se completa, a célula hospedeira se rompe e formas amastigotas e/ou tripomastigotas são liberadas no interstício. Formas tripomastigotas íntegras são capazes de alcançar a circulação sanguínea e infectar uma ampla variedade de células em vários tecidos do hospedeiro, mas particularmente células musculares lisas, esqueléticas e cardíacas. Por outro lado, triatomínios infectam-se ao ingerirem formas tripomastigotas sanguíneas do parasito durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado com *T. cruzi*. No intestino médio do vetor, as formas tripomastigotas ingeridas se diferenciam em formas

epimastigotas que se multiplicam intensamente por fissão binária. No intestino posterior, formas epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas capazes de infectar um novo hospedeiro vertebrado susceptível, perpetuando o ciclo de transmissão (FIG. 2).

A implementação de programas intensivos de controle da transmissão vetorial tem sido bem sucedida em vários países da América Latina, tais como: Brasil, Chile, Uruguai e Argentina. No Brasil, a transmissão vetorial por *T. infestans* foi oficialmente eliminada em 2006, graças à implementação de um programa de controle que começou em 1950 em algumas áreas endêmicas e tornou-se nacional em 1983, o que foi suficiente para reduzir o número de casos novos da doença de 100.000 em 1970 para apenas 10 em 2007. Além disso, o processo de urbanização também contribuiu significativamente para a drástica redução na incidência da doença no país nas últimas décadas. Entretanto, a transmissão por triatomíneos hematófagos silvestres infectados tem aumentado em áreas próximas à floresta na região amazônica. Além disso, outras vias alternativas de transmissão do parasito, tais como: transfusão sanguínea, transplante de órgãos, congênita e oral, ainda são muito importantes em vários países da América Latina. No Brasil, a transmissão oral representa um importante problema de saúde pública, principalmente na região amazônica. Essa via de transmissão tem recebido maior atenção após um surto da doença em Santa Catarina em 2005, no qual cinco pessoas morreram após a ingestão de caldo de cana contaminado com o parasito. Portanto, a manutenção de sistemas sustentáveis de vigilância epidemiológica e intervenção em casos de surto é essencial para manter o controle da doença. É importante lembrar também que vários países da América Latina ainda não implementaram programas sustentáveis de vigilância epidemiológica e controle da transmissão vetorial de *T. cruzi*. Além disso, a manutenção do complexo ciclo silvestre de transmissão de *T. cruzi* constitui um imenso reservatório do parasito e representa uma constante ameaça para milhões de indivíduos (DIAS *et al.*, 2002; DIAS, 2007; COURA & DIAS, 2009).

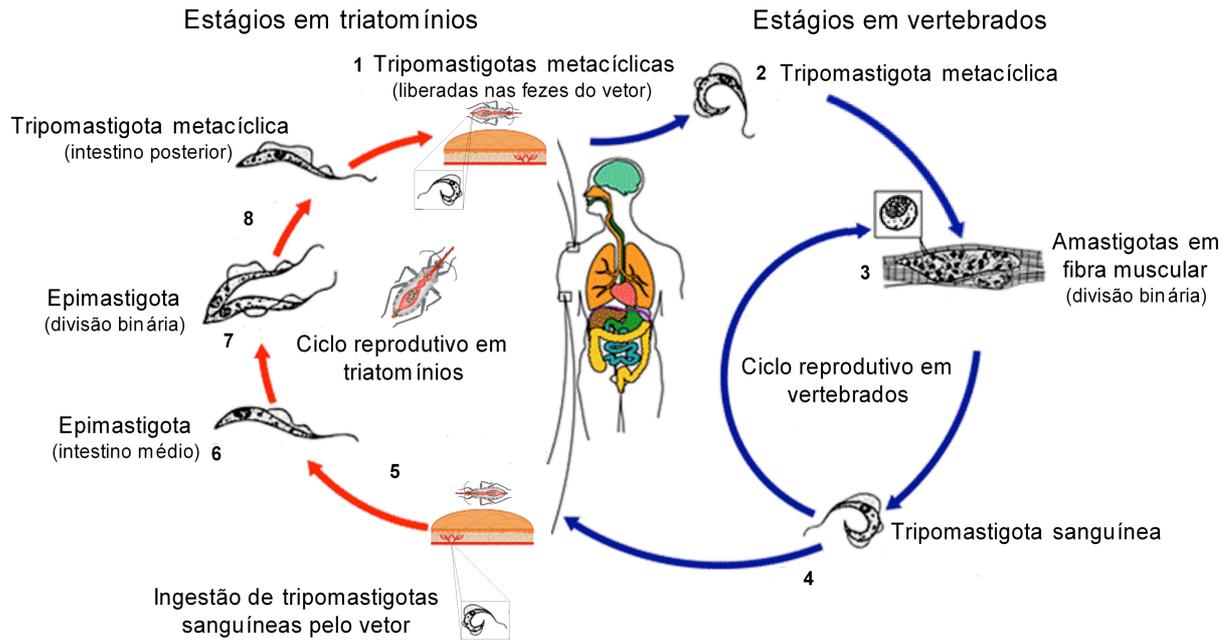


FIGURA 2 - Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. A infecção ocorre após o contato com formas tripomastigotas metacíclicas infectantes presentes nas dejeções liberadas próximo ao local da picada, durante o repasto sanguíneo, por triatomíneos infectados. As formas tripomastigotas precisam de soluções de continuidade (mucosas intactas ou lesões na pele) para infectar o hospedeiro (1). Após a infecção, as formas tripomastigotas invadem vários tipos de células do hospedeiro e no citoplasma diferenciam-se em formas amastigotas (2), que se reproduzem assexuadamente por fissão binária (3). A seguir, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, as quais são liberadas no interstício após a ruptura da célula hospedeira. A partir daí podem alcançar a circulação sanguínea (4), iniciando um novo ciclo de infecção. Alternativamente, triatomíneos infectam-se com formas tripomastigotas circulantes durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado previamente infectado (5). As formas tripomastigotas ingeridas diferenciam-se em formas epimastigotas que se multiplicam no intestino médio (6 - 7) e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas infectantes no intestino posterior do vetor (8) perpetuando o ciclo de transmissão do parasito (modificado a partir de: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>).

### I.3. Variabilidade genética em *Trypanosoma cruzi*

O tamanho do genoma diplóide de *T. cruzi* foi estimado em 106,4 a 110,7 Mb e seu genoma haplóide apresenta ~12.000 genes. O DNA mitocondrial (kDNA) codifica RNAs ribossômicos e enzimas da respiração celular e é constituído por milhares de moléculas de minicírculos e dezenas de moléculas de maxicírculos topologicamente concatenadas numa rede complexa (EL-SAYED *et al.*, 2005). Cada molécula de minicírculo apresenta ~1,4 Kb e possui quatro regiões conservadas, com 120 a 160 pb, dispostas em ângulo reto entre si e flanqueadas por quatro regiões variáveis, com 280 a 320 pb, altamente polimórficas. As regiões variáveis do kDNA codificam RNAs guia (gRNAs), que estão envolvidos no processo de edição de moléculas de mRNA que codificam enzimas mitocondriais do parasito. Devido ao seu alto polimorfismo e elevado número de cópias por célula, moléculas de minicírculos do kDNA de *T. cruzi* são alvos preferenciais para a detecção do parasito por PCR (VAGO *et al.*, 1996b; VAGO *et al.*, 2000; LAGES-SILVA *et al.*, 2006).

O parasito se reproduz principalmente por fissão binária, conseqüentemente seu genoma é transmitido *en bloc* para a progênie. Portanto, *T. cruzi* apresenta grau extremo de desequilíbrio de ligação e estrutura populacional predominantemente clonal (TIBAYRENC *et al.*, 1986). O parasito apresenta uma ampla e bem caracterizada diversidade intra-específica, que tem sido demonstrada por diferentes grupos de pesquisa por várias abordagens experimentais (MACEDO & PENA, 1998; MACEDO *et al.*, 2001; DEVERA *et al.*, 2003; PENA *et al.*, 2009). Uma das primeiras evidências experimentais, demonstrando a ampla diversidade intra-específica em *T. cruzi*, foi obtida através da análise de variantes eletroforéticas de seis isoenzimas, o que permitiu a identificação de três grupos principais ou zimodemas (Z1, Z2 e Z3). Estudos epidemiológicos revelaram que os zimodemas Z1 e Z3 estavam associados ao ciclo silvestre e o zimodema Z2 ao ciclo doméstico de transmissão do

parasito (MILES *et al.*, 1978). Análises subsequentes usando 15 isoenzimas, em amostras de *T. cruzi* provenientes de diferentes regiões geográficas, revelaram uma maior diversidade intra-específica e permitiram a identificação de 43 *clonets* diferentes (TIBAYRENC *et al.*, 1986; TIBAYRENC & AYALA, 1988).

A introdução de técnicas de biologia molecular baseadas em PCR iniciou uma nova era no estudo da variabilidade intra-específica em *T. cruzi*. Os primeiros estudos de polimorfismo de DNA em *T. cruzi* foram publicados por Morel *et al.* (1980) e revelaram polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) em moléculas de minicírculos do kDNA do parasito. Com base nesses estudos foram introduzidos os esquizodemas, que designam populações de *T. cruzi* com padrões de restrição de minicírculos idênticos ou muito semelhantes (MOREL *et al.*, 1980). A aplicação dessa abordagem permitiu demonstrar pela primeira vez que um determinado isolado de *T. cruzi* pode apresentar dois ou mais clones distintos (MOREL & SIMPSON, 1980). Posteriormente, Souto *et al.* (1996) desenvolveram uma técnica de PCR para a amplificação do espaçador não transcrito do gene de mini-éxon, o que permitiu agrupar as populações de *T. cruzi* em dois grupos de acordo com o tamanho dos produtos amplificados. Populações de *T. cruzi* com *amplicon* de 300 pb foram colocadas no grupo 1 e aquelas com *amplicon* de 350 pb no grupo 2 (SOUTO *et al.*, 1996). Além disso, a análise de sequências do gene rDNA 24S $\alpha$  de *T. cruzi* e de outros tripanosomatídeos revelaram alta homologia entre as diferentes espécies avaliadas, exceto para uma região de ~100 pb na extremidade 3' do gene, a qual foi denominada região divergente D7. A amplificação da região divergente D7 revelou a existência de um dimorfismo de tamanho, o que permitiu a classificação das populações de *T. cruzi* em dois grandes grupos: grupo 1 com *amplicon* de 125 pb e grupo 2 com *amplicon* de 110 pb (SOUTO & ZINGALES, 1993).

A utilização de diferentes abordagens experimentais foi essencial para a compreensão da estrutura populacional de *T. cruzi* e permitiu a definição de vários subgrupos relevantes por

diferentes grupos de pesquisa. Porém, isso acabou gerando certa confusão na literatura científica em relação à nomenclatura de populações do parasito. Então, durante o Simpósio Internacional comemorativo dos 90 anos da descoberta da DC, foi estabelecida a divisão de *T. cruzi* em duas linhagens filogenéticas principais: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (ANONYMOUS, 1999). Populações de *T. cruzi* pertencentes à linhagem *T. cruzi* I apresentam zimodema Z1, rDNA 24S $\alpha$  2 e mini-éxon 2, estão primariamente associadas ao ciclo silvestre e induzem baixo parasitismo em pacientes chagásicos. Enquanto, populações do parasito pertencentes à linhagem *T. cruzi* II apresentam zimodema Z2, rDNA 24S $\alpha$  1 e mini-éxon 1, estão associadas ao ciclo doméstico, causam infecções com elevada parasitemia em áreas endêmicas clássicas e estão associadas a manifestações clínicas mais graves da doença em humanos (ZINGALES *et al.*, 1999). É importante ressaltar que algumas populações do parasito, por apresentarem características híbridas ou incongruentes, não puderam ser classificadas em uma das duas linhagens filogenéticas principais e foram designadas apenas como *T. cruzi* (ANONYMOUS, 1999).

Com a finalidade de acomodar populações de *T. cruzi* híbridas ou incongruentes, Brisse *et al.* (2000) propuseram a divisão de *T. cruzi* em seis linhagens filogenéticas discretas, referidas como DTUs, através da análise de isoenzimas e perfis de RAPD. O esquema DTU é definido como uma coleção de populações de *T. cruzi* que compartilham marcadores moleculares comuns. Nesse sistema, populações de *T. cruzi* I permaneceram como uma linhagem filogenética única correspondendo ao DTU I. Por outro lado, o DTU II foi fracionado em cinco sublinhagens filogenéticas. Cada uma dessas sublinhagens foi representada por uma cepa de referência: CanIII c11 (IIa), Esmeraldo c13 (IIb), M5631 c15 (IIc), MN c12 (IId) e CL Brener (IIE). Nesse sistema de classificação o DTU IIb corresponde à linhagem *T. cruzi* II (BRISSE *et al.*, 2000; BRISSE *et al.*, 2001). Posteriormente, Freitas *et al.* (2006) caracterizaram molecularmente uma terceira linhagem filogenética ancestral designada

*T. cruzi* III, a qual acomoda parte das populações de *T. cruzi* pertencentes ao Zimodema Z3 e correspondentes à sublinhagem IIc. Através de cuidadosa dissecação de blocos gênicos transmitidos estavelmente de geração a geração do parasito foi proposta a ocorrência de no mínimo dois eventos de hibridização, entre as linhagens parentais *T. cruzi* II e *T. cruzi* III, que produziram progênes viáveis evolutivamente e levaram à formação de populações de *T. cruzi* híbridas. Em ambos os eventos, o doador de DNA mitocondrial para a população de *T. cruzi* híbrida foi *T. cruzi* III, não sendo encontradas populações de *T. cruzi* híbridas originadas a partir de *T. cruzi* I (FREITAS *et al.*, 2006). Recentemente, durante as comemorações do centenário de descoberta da DC, foi estabelecida a divisão de *T. cruzi* em seis linhagens filogenéticas principais graças aos avanços na compreensão da estrutura populacional do parasito, o que certamente facilitará a comunicação entre os membros da comunidade científica (ZINGALES *et al.*, 2009). As linhagens *T. cruzi* I e *T. cruzi* II correspondentes aos DTUs I e IIb, respectivamente, continuaram como originalmente definidas (ANONYMOUS, 1999). Além disso, foram propostas mais quatro linhagens filogenéticas: *T. cruzi* III que corresponde ao DTU IIc, *T. cruzi* IV que corresponde ao DTU IIa, bem como as linhagens híbridas *T. cruzi* V e VI que equivalem aos DTUs II d e IIe, respectivamente (TAB. 1).

TABELA 1 - Nomenclatura padronizada de populações de *Trypanosoma cruzi*.

<i>Linhagens filogenéticas principais*</i>	<i>Denominação prévia</i>
<i>T. cruzi</i> I (TcI)	<i>T. cruzi</i> I e DTU I
<i>T. cruzi</i> II (TcII)	<i>T. cruzi</i> II e DTU IIb
<i>T. cruzi</i> III (TcIII)	Z3/Z1 ASAT; Z3-A: DTU IIc e <i>T. cruzi</i> III
<i>T. cruzi</i> IV (TcIV)	Z3; Z3-B e DTU IIa
<i>T. cruzi</i> V (TcV)	Boliviana Z2; rDNA 1/2, clonet 39 e DTU II d
<i>T. cruzi</i> VI (TcVI)	Paraguaia Z2, Zimodema B, e DTU IIe

\*A designação das linhagens filogenéticas principais foi feita de acordo com Zingales *et al.*, 2009.

#### I.4. Patogênese da doença de Chagas

A complexidade da interrelação parasito-hospedeiro constitui o mais intrigante desafio para a compreensão da patogênese da DC. Do ponto de vista clínico, a DC apresenta duas fases principais: a fase aguda e a crônica. A fase aguda da doença começa após um curto período de incubação e dura em torno de quatro a oito semanas após a infecção. Embora seja caracterizada por elevada carga parasitária e intensa resposta inflamatória tecidual, a fase aguda apresenta-se oligossintomática na maioria dos casos. Entre as manifestações clínicas relatadas durante a fase aguda da doença estão: febre, mal estar, hiperplasia de gânglios linfáticos, hepatoesplenomegalia e cardiomegalia. Complicações neurológicas (encefalite) e/ou cardíacas (miocardite) potencialmente fatais podem ser observadas em cerca de 5% dos indivíduos infectados durante a fase aguda da doença. Entretanto, a maioria dos indivíduos infectados controla a replicação do parasito, sobrevive à fase aguda da doença e evolui para uma fase latente subclínica denominada *forma indeterminada*, que é caracterizada por ausência de sinais e sintomas específicos da DC. Porém, uma proporção significativa dos indivíduos cronicamente infectados com *T. cruzi* desenvolve manifestações clínicas graves e potencialmente fatais da doença, 10 a 30 anos após a infecção (FIG. 3) (PRATA, 2001; MAGUIRE, 2006). A infecção de células musculares lisas do trato digestivo e estriadas cardíacas pode levar à persistência da resposta inflamatória tecidual, o que pode produzir anormalidades digestivas (esofagopatia e colopatia) e cardíacas (cardiomiopatia) discretas a intensas, dependendo da extensão das alterações patológicas teciduais, o que por sua vez determina a morbidade e mortalidade associadas à doença (PRATA, 2001; ROCHA *et al.*, 2003; MENEGHELLI, 2004). A destruição de neurônios autonômicos viscerais do trato digestivo de chagásicos crônicos pode resultar em dilatação do esôfago (megaesôfago) e cólon (megacólon) e levar a alterações da motilidade gastrointestinal, que caracterizam a *forma digestiva* da doença (DIAS, 1992; PRATA, 2001; MENEGHELLI, 2004). Por outro lado, a

persistência da miocardite entre chagásicos crônicos pode produzir extensa destruição de cardiomiócitos, graves danos ao sistema de condução cardíaco e desencadear alterações estruturais irreversíveis, que podem resultar em arritmias cardíacas complexas e levar à cardiomiopatia. Uma vez instalada, a cardiomiopatia evolui lentamente para insuficiência cardíaca congestiva, a manifestação clínica mais grave da DC (DIAS, 1992; PRATA, 2001; ROCHA *et al.*, 2003). A alta prevalência da *forma cardíaca* é um dos principais problemas enfrentados durante a evolução clínica da doença, pois as cardiomiopatias são a causa mais comum de invalidez e mortalidade entre pacientes chagásicos na faixa etária mais produtiva da vida, entre 20 e 59 anos. Além disso, é importante lembrar que uma proporção significativa de pacientes chagásicos crônicos desenvolve a chamada *forma mista* ou *cárdio-disgestiva* da doença (CARRASCO *et al.*, 1997). A gravidade e prevalência das diferentes formas clínicas da DC variam geograficamente, mas as causas dessa heterogeneidade clínica e epidemiológica ainda é uma questão não esclarecida (DIAS, 1992; PRATA, 2001).

Apesar de muitas incertezas, está cada vez mais claro que a patogênese da DC é complexa e multifatorial sendo influenciada por fatores inerentes ao parasito (*background* genético, inoculo, reinfeção, coinfeção, infecções concomitantes, tropismo tecidual, virulência e patogenicidade) ao hospedeiro (*background* genético, sexo, idade, estado nutricional, doenças concomitantes, fatores hormonais e estado imunológico), bem como por fatores sócio-econômicos e ambientais, tais como: pobreza, estresse, nutrição e intervenções terapêuticas (ROTTENBERG *et al.*, 1993; TARLETON *et al.*, 1996; DE LANA *et al.*, 1998; ANDRADE *et al.*, 1999; CHANDRA, 1999; DE LANA *et al.*, 2000; COX, 2001; ANDRADE *et al.*, 2002; FRANCO *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2005; AVITSUR *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2006; RAMASAWMY *et al.*, 2006; RAMASAWMY *et al.*, 2007; DUTRA & GOLLOB, 2008; RAMASAWMY *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2009; DUTRA *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2009).

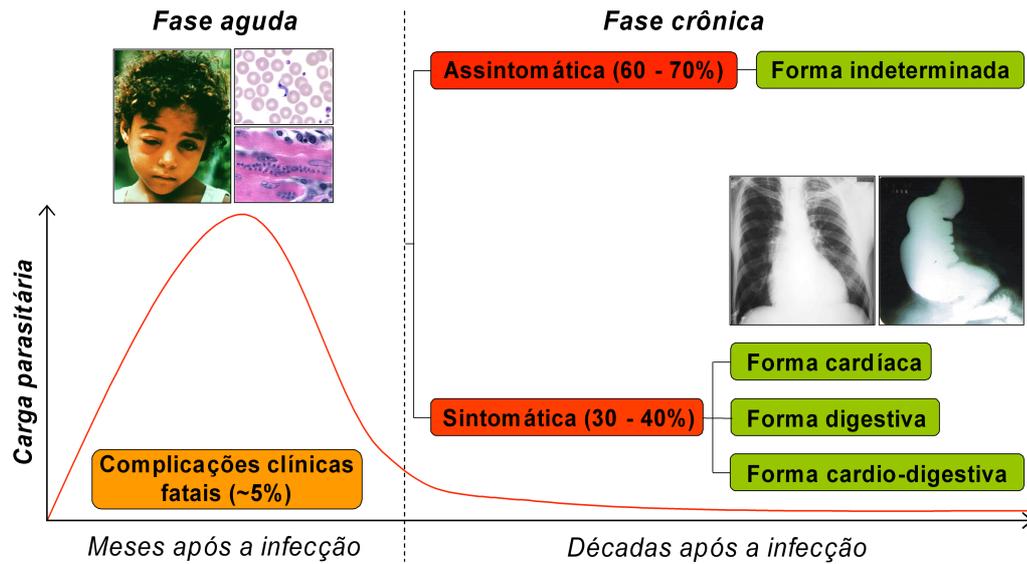


FIGURA 3 - Evolução clínica da doença de Chagas. A fase aguda dura de dois a quatro meses após a infecção e embora seja caracterizada por elevada carga parasitária, a maioria dos indivíduos infectados apresenta-se assintomática, o que dificulta o diagnóstico e tratamento precoce da doença. Se a infecção é detectada precocemente, os indivíduos são submetidos a tratamento específico com eficácia em torno 75%. Entretanto, se o tratamento não for bem sucedido ou se o diagnóstico precoce não for feito, a doença evolui para a fase crônica. A transição da fase aguda para a crônica é acompanhada por uma queda dramática na carga parasitária devido ao controle da replicação do parasito pela resposta imune do hospedeiro. A maioria dos indivíduos que evoluem para a fase crônica permanece assintomática, mas uma fração significativa desenvolve manifestações clínicas graves da doença (formas cardíaca e/ou digestiva) entre 10 - 30 anos após a infecção.

#### I.4.1. Papel da variabilidade genética do parasito na patogênese da doença de Chagas

Inicialmente, após a descoberta da infecção por *T. cruzi* em humanos, não houve nenhum questionamento em relação ao papel do parasito na patogênese da DC (CHAGAS, 1909). A existência de um amplo espectro de manifestações clínicas da doença foi logo observada, o que conduziu naturalmente à suposição de que essas diferenças eram devidas à variabilidade intra-específica do parasito. Esse período foi marcado por uma intensa, embora infrutífera, busca por marcadores que permitissem estabelecer uma correlação entre a variabilidade do parasito e as manifestações clínicas da doença. A falha dessa abordagem, associada à escassez de parasitos com intensa inflamação tecidual e autoreatividade em pacientes cronicamente infectados, relegou a um segundo plano a participação de *T. cruzi* na patogênese da doença e sugeriu que as graves alterações patológicas cardíacas e/ou digestivas observadas durante a evolução clínica da DC seriam devidas à indução de respostas autoimunes desencadeadas pelo parasito (KIERSZENBAUM, 1999; 2003; 2007; MARINNETO *et al.*, 2007; SAVINO *et al.*, 2007; DUTRA *et al.*, 2009).

Com o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis, tem sido possível detectar o parasito diretamente em amostras de tecidos provenientes de pacientes cronicamente infectados, o que mostra a necessidade de se investigar com maior profundidade o papel da persistência de *T. cruzi* na evolução clínica da doença (BELLOTTI *et al.*, 1996; VAGO *et al.*, 1996a; VAGO *et al.*, 1996b; TARLETON *et al.*, 1997; VAGO *et al.*, 2000). Apesar de muitas incertezas em relação à origem dos antígenos que induzem e mantêm a resposta imune durante o curso da infecção por *T. cruzi* é amplamente aceito que o sistema imune apresenta um papel essencial na patogênese da DC, pois distúrbios na regulação da atividade imunológica podem resultar em efeitos colaterais potencialmente fatais para o hospedeiro durante a evolução clínica da doença (SAVINO *et al.*, 2007; DUTRA & GOLLOB, 2008;

DUTRA *et al.*, 2009). Portanto, a persistência de *T. cruzi* não deveria ser considerada uma falha do sistema imune, mas um compromisso com a manutenção da homeostase do organismo, pois uma resposta imune muito intensa contra o parasito poderia muito bem resultar na sua erradicação, mas ao mesmo tempo causar danos irreversíveis ao hospedeiro.

Atualmente, as manifestações clínicas da DC são vistas como o resultado da interação de dois genomas altamente complexos: os genomas do parasito e do hospedeiro (MACEDO *et al.*, 2004). Como discutido anteriormente, estima-se que *T. cruzi* tenha emergido como espécie há ~150 milhões de anos e o primeiro contanto com *H. sapiens* ocorrido mais recentemente, há ~15.000 anos, quando os primeiros seres humanos chegaram ao continente Americano (BRIONES *et al.*, 1999; MACEDO *et al.*, 2001). Portanto, humanos podem ser considerados um acidente recente na história evolucionária do parasito, sendo natural supor que nem todas as populações de *T. cruzi* sejam capazes de infectar e causar doença em seres humanos. De fato, estudos epidemiológicos demonstram que, pelo menos no Brasil e Argentina, a infecção por *T. cruzi* II é mais comum e frequentemente associada a manifestações clínicas mais graves da DC; enquanto a infecção por *T. cruzi* I é mais rara e usualmente assintomática (ZINGALES *et al.*, 1998; BRIONES *et al.*, 1999). Entretanto, ainda não foi possível fazer uma correlação entre a variabilidade genética do parasito e as manifestações clínicas da doença. Uma possível explicação para essa falta de correlação é que a maioria dos estudos, conduzidos com a finalidade de avaliar essa possível correlação, envolveu populações de *T. cruzi* mantidas por sucessivas passagens em animais de laboratório ou cultivadas *in vitro* em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*). Esses sistemas de manutenção de isolados do parasito podem levar à seleção de clones mais aptos a sobreviverem nessas condições, o que pode explicar, pelo menos em parte, a falta de correlação entre a variabilidade genética do parasito e as manifestações clínicas da doença. Além disso, devido ao tropismo diferencial de diferentes clones de *T. cruzi* para diferentes tecidos de pacientes

chagásicos, a constelação de clones, presentes no sangue durante a realização do xenodiagnóstico e/ou hemocultura, pode ser muito diferente daqueles presentes em outros tecidos. Em conjunto, esses fatores representam um enorme obstáculo para a compreensão do papel da variabilidade genética do parasito na evolução clínica da DC. De fato, resultados obtidos por Vago *et al.* (2000) mostraram que populações de *T. cruzi* com perfis genéticos distintos podem ser encontradas em diferentes tecidos (esôfago e coração) do mesmo paciente, o que constitui uma forte evidência a favor da ocorrência de tropismo tecidual diferencial de diferentes populações do parasito (VAGO *et al.*, 2000).

Recentemente, Mantilla *et al.* (2010) observaram a coexistência de diferentes populações de *T. cruzi* em um paciente chagásico crônico que sucumbiu à forma cardíaca da doença. Análises moleculares de amostras de esôfago e tecido cardíaco revelaram a presença de uma população do parasito pertencente à linhagem *T. cruzi* I exclusivamente no esôfago e outra da linhagem *T. cruzi* II no coração, o que mostra claramente a coexistência de diferentes populações do parasito e representa mais uma evidência da importância do tropismo tecidual diferencial de diferentes populações do parasito na evolução clínica da doença (MANTILLA *et al.*, 2010). Experimentalmente, Andrade *et al.* (1999) fizeram a avaliação o tropismo tecidual diferencial de diferentes populações de *T. cruzi*, através da infecção de camundongos BALB/c com a cepa JG (*Tc* II) e/ou com o clone Col1.7G2 (*Tc* I) (ANDRADE *et al.*, 1999). Após a infecção, os animais foram sacrificados na fase aguda ou crônica da doença e a distribuição tecidual diferencial das respectivas populações de *T. cruzi* foi avaliada por PCR. As análises moleculares realizadas em três ou seis meses após a infecção mostraram uma predominância de Col1.7G2 sobre JG no esôfago, reto, diafragma e sangue, enquanto uma seleção estrita de JG foi observada no músculo cardíaco de animais coinfectados com as duas populações do parasito, o que sugere fortemente que aspectos genéticos de *T. cruzi* apresentam um papel importante na determinação do tropismo tecidual e conseqüentemente podem

influenciar a evolução clínica da DC (ANDRADE *et al.*, 1999). É importante ressaltar que o clone Col1.7G2, isolado de um paciente com a forma cardíaca da doença, apresentou tropismo para músculo liso em camundongos; enquanto a cepa JG, isolada de paciente com a forma digestiva, mostrou tropismo para músculo estriado em camundongos, o que pode ser explicado por diferenças interespecíficas entre seres humanos e camundongos, uma vez que a patogênese da doença é influenciada pelo *background* genético do hospedeiro. Entretanto, eventos de seleção durante o isolamento e/ou manutenção das respectivas populações do parasito em laboratório não podem ser descartados.

#### I.4.2. Papel da variabilidade genética do hospedeiro na patogênese da doença de Chagas

A DC apresenta uma ampla heterogeneidade clínica, mas as causas dessa variabilidade ainda é uma questão não esclarecida. Pacientes com cardiomiopatia crônica, a manifestação clínica mais grave da DC, apresentam graves disfunções cardíacas e desordens inflamatórias sistêmicas (HIGUCHI *et al.*, 2003). De fato, miocardite intensa caracterizada por elevada expressão de TNF- $\alpha$  por células inflamatórias presentes no miocárdio, bem como por altos níveis circulantes de TNF- $\alpha$  têm sido observada entre pacientes com a forma cardíaca em relação àqueles com a forma indeterminada da doença, o que sugere fortemente que a produção crônica de TNF- $\alpha$  represente um papel crucial na patogênese da DC (REIS *et al.*, 1993; TALVANI *et al.*, 2004). A suscetibilidade genética à cardiomiopatia chagásica crônica tem sido avaliada na população Brasileira, através da caracterização de polimorfismos em genes que codificam moléculas envolvidas na atividade imunológica. A análise de polimorfismos nas posições -22C/G e -348C/T na região promotora do gene *BAT-1*, que provavelmente codifica um mediador anti-inflamatório, em pacientes com a forma cardíaca ou indeterminada da DC revelou que a susceptibilidade à cardiomiopatia chagásica crônica

está associada a variantes C em ambas as posições avaliadas, o que sugere que essas variantes possam ser menos eficientes em regular a produção de mediadores pró-inflamatórios em pacientes com a forma cardíaca da doença (RAMASAWMY *et al.*, 2006). Além disso, a análise de variantes nas posições +80A/C e +252A/G na região codificadora do gene para a linfotóxina- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ), uma citocina pró-inflamatória com propriedades biológicas semelhantes às do TNF- $\alpha$ , em pacientes com a forma cardíaca ou indeterminada da DC revelou que o haplótipo +80A+252A está associado à proteção contra cardiomiopatia chagásica crônica, o haplótipo +80C+252G está associado à susceptibilidade e a presença do genótipo +80AA correlaciona-se com níveis mais baixos de TNF- $\alpha$  circulante (RAMASAWMY *et al.*, 2007). Recentemente, a investigação de polimorfismos presentes nas posições -62A/T e -262A/G na região promotora do gene *I $\kappa$ BL*, que codifica um provável inibidor do fator de transcrição *NF $\kappa$ B*, em pacientes com a forma cardíaca ou indeterminada da DC revelou que a presença do genótipo -62AA está associada a um risco três vezes maior de desenvolver cardiomiopatia chagásica crônica em relação ao genótipo -62TT, o que também foi observado para o genótipo -262AA. A presença do haplótipo -262A-62A foi associada à cardiomiopatia chagásica crônica (RAMASAWMY *et al.*, 2008). Além disso, foi feita a avaliação da associação entre um polimorfismo funcional na posição -1082G/A na região promotora do gene que codifica a IL-10, uma importante citocina imunomoduladora, e o desenvolvimento de cardiomiopatia crônica entre pacientes chagásicos. O polimorfismo funcional na posição -1082G/A na região promotora do gene que codifica a IL-10 seguiu uma distribuição não randômica entre pacientes chagásicos com diferentes manifestações clínicas da doença. A presença do genótipo AA foi associada ao desenvolvimento de cardiomiopatia chagásica crônica e determina um menor nível de expressão de IL-10 em relação aos genótipos GG e GA. A análise da correlação entre a intensidade de expressão de IL-10 por células mononucleares sanguíneas, provenientes de pacientes chagásicos com genótipo G<sup>+</sup>, estimuladas com antígenos do parasito e a função

cardíaca dos pacientes, avaliada através da determinação da fração de ejeção ventricular esquerda, revelou uma correlação positiva entre essas duas variáveis, o que demonstra uma associação entre o polimorfismo de nucleotídeo único na posição -1082G/A da região promotora do gene que codifica a IL-10 e o desenvolvimento de cardiomiopatia chagásica crônica (COSTA *et al.*, 2009). Portanto, a caracterização de polimorfismos genéticos associados às manifestações clínicas da DC pode ajudar na identificação de indivíduos em risco de desenvolver cardiomiopatia, o que é importante para o acompanhamento clínico de pacientes chagásicos e pode contribuir para a diminuição da mortalidade associada à doença.

No contexto da infecção experimental por *T. cruzi*, o papel do *background* genético do hospedeiro no tropismo tecidual diferencial de diferentes populações do parasito foi avaliado por Andrade *et al.* (2002), através da infecção de camundongos de diferentes linhagens com JG e/ou Col1.7G2. Camundongos BALB/c e DBA-2 coinfetados com JG e Col1.7G2 apresentaram o mesmo padrão de distribuição tecidual das respectivas populações de *T. cruzi*, com predomínio de JG no coração e Col1.7G2 nas demais amostras de tecidos analisados. Resultados completamente diferentes foram observados entre camundongos C57BL/6 e Swiss coinfetados com JG e Col1.7G2. Em animais C57BL/6 foi observado um predomínio de Col1.7G2 em quase todas as amostras de tecido analisadas, inclusive coração. Em camundongos Swiss também houve seleção de Col1.7G2 em quase todas as amostras de tecido analisadas, exceto no sangue e reto, nos quais predominou JG. Em conjunto, esses resultados demonstram claramente uma influência de aspectos genéticos do hospedeiro na distribuição tecidual de diferentes populações de *T. cruzi*.

É importante ressaltar que camundongos BALB/c e DBA-2 compartilham o mesmo haplótipo H-2 (H-2<sup>d</sup>), animais C57BL/6 apresentam haplótipo H-2<sup>b</sup>, enquanto camundongos Swiss são geneticamente diferentes, o que sugere que a variabilidade genética do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) influencia o perfil de distribuição tecidual de

diferentes populações de *T. cruzi* (ANDRADE *et al.*, 2002). De fato, Freitas *et al.* (2009) trabalhando com duas linhagens congênicas de camundongos, C57BLKS/J (H-2<sup>d</sup>) e BALB/B10-H2<sup>b</sup> (H-2<sup>b</sup>), e suas contrapartes normais, C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) e BALB/c (H-2<sup>d</sup>), infectadas com JG e/ou Col1.7G2 observaram uma predominância tanto *in vivo* quanto *ex vivo* de uma das duas populações do parasito em amostras de tecido cardíaco provenientes de animais coinfetados. O haplótipo H-2<sup>d</sup> selecionou Col1.7G2 e o H-2<sup>b</sup> selecionou JG, o que sugere fortemente que a variabilidade genética do MHC influencia o padrão de distribuição tecidual diferencial de diferentes populações de *T. cruzi* (FREITAS *et al.*, 2009).

Condições ambientais, tais como estresse, nutrição e intervenções terapêuticas também podem potencialmente influenciar a evolução clínica da DC. De fato, várias linhas de evidência mostram que o estresse, uma complexa resposta biológica a desafios internos, tais como dificuldades fisiológicas (escassez de alimento) e carga psicológica (solidão), e/ou externos, tais como mudanças ambientais (temperaturas extremas), que perturbam a homeostase do organismo, pode influenciar significativamente a atividade imunológica do hospedeiro (AVITSUR *et al.*, 2006); e conseqüentemente a evolução clínica da doença desencadeada pela infecção por *T. cruzi* (SANTOS *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2008). Em relação ao papel do estado nutricional do hospedeiro, é importante lembrar que infecção e desnutrição agravam-se mutuamente. De fato, deficiência nutricional está comumente associada à imunossupressão, caracterizada por deficiências principalmente na imunidade celular, atividade fagocitária, produção de citocinas, anticorpos (Abs: *antibody*) e proteínas do complemento, que em conjunto são essências no contexto da infecção por *T. cruzi*. Além disso, é importante lembrar que desnutrição grave é a causa mais comum de imunodeficiência ao redor do mundo (CHANDRA, 1999). Como a DC afeta principalmente populações pobres em países subdesenvolvidos da América Latina e a pobreza está intimamente associada à desnutrição, o estado nutricional de indivíduos acometidos pela doença deveria ser levado em

consideração. Em relação ao papel de intervenções terapêuticas no contexto da DC, é amplamente reconhecido que o tratamento específico com drogas com atividade tripanocida, tais como: *benzonidazol* e *nifurtimox*, é potencialmente capaz de curar indivíduos infectados com *T. cruzi*, principalmente quando a doença é diagnosticada precocemente (fase aguda). Além disso, a doença pode ser reativada em pacientes chagásicos submetidos à transplantação de órgãos, devido à terapia com drogas imunossupressoras usadas para prevenir a rejeição do órgão transplantado (FERREIRA, 1999).

Na natureza, infecções concomitantes envolvendo diferentes classes de patógenos são comuns. O termo infecção concomitante, também chamado infecção mista, tradicionalmente refere-se à situação na qual dois ou mais agentes infecciosos coexistem no mesmo hospedeiro. Entretanto, à luz da biologia moderna a definição de infecção concomitante que será usada aqui é aquela na qual dois ou mais agentes infecciosos geneticamente diferentes coexistem no mesmo hospedeiro, o que permite a inclusão tanto de agentes infecciosos pertencentes a diferentes espécies, a visão comumente aceita de infecção mista, quanto de agentes infecciosos da mesma espécie geneticamente diferentes (COX, 2001). Virtualmente em todas as combinações avaliadas em condições controladas, que envolveram infecções concomitantes com *T. cruzi* e uma outra espécie de patógeno (vírus, protozoário ou helminto) um ou outro agente infeccioso foi afetado pela presença do outro e às vezes ambos foram afetados (COX, 2001). A combinação de protozoários e vírus frequentemente resulta em uma exacerbação da doença em relação à infecção apenas com o protozoário, o que tem sido atribuído aos efeitos imunossupressores desencadeados por infecções virais. De fato, as combinações envolvendo *T. cruzi* e um vírus resultam em manifestações clínicas mais graves em animais coinfectados: a infecção com o vírus da leucemia murina ou com o vírus da hepatite murina resulta na exacerbação de infecções por *T. cruzi* em camundongos. Em ambos os casos os animais coinfectados desenvolvem uma síndrome de imunodeficiência adquirida,

que torna as células T provenientes desses animais incapazes de responder a antígenos derivados de *T. cruzi*, o que tem sido atribuído aos efeitos imunossupressores induzidos pela infecção viral (COX, 2001). É importante lembrar que pacientes que sobreviveram à fase aguda da infecção por *T. cruzi* podem sucumbir à DC devido a desordens imunológicas, tais como a AIDS, uma imunodeficiência adquirida causada pelo HIV, um vírus capaz de induzir imunossupressão profunda no hospedeiro, o que o torna mais susceptíveis a patógenos oportunistas, inclusive o *T. cruzi* (FERREIRA, 1999). Existem também relatos dramáticos de interações entre espécies de protozoários filogeneticamente distantes envolvendo principalmente parasitos sanguíneos. A infecção experimental por *T. cruzi* é exacerbada pela coinfeção com *Plasmodium berghei* em camundongos (COX, 2001). Além disso, virtualmente em todas as situações envolvendo infecções concomitantes com protozoários e helmintos investigadas experimentalmente, há algum grau de interação, algumas vezes dramático. Entre outras interações interessantes envolvendo protozoários e helmintos está aquela entre *T. cruzi* e *Taenia crassiceps*, na qual a coinfeção com os dois patógenos tem apenas um discreto efeito na parasitemia em camundongos. Entretanto, se o animal é infectado com *T. crassiceps* e mais tardiamente com *T. cruzi* há um aumento na susceptibilidade à infecção por *T. cruzi* (COX, 2001). O resultado de qualquer interação envolvendo diferentes agentes infecciosos não é necessariamente previsível e pode variar de acordo com o estágio da infecção, bem como com fatores inerentes ao parasito e ao hospedeiro como discutido previamente, mas o importante é reconhecer que essas interações ocorrem e não podem ser ignoradas, principalmente durante a condução de estudos envolvendo seres humanos.

### I.5. Resposta imune no contexto da infecção por *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* expressa várias moléculas essenciais ao processo de invasão celular e é capaz de infectar uma ampla variedade de células, o que é não apenas uma importante estratégia de evasão do sistema imune, mas também é crucial para a sobrevivência e replicação do parasito em hospedeiros vertebrados (ANDRADE & ANDREWS, 2005). Além disso, o parasito produz várias moléculas capazes de ativar fortemente a imunidade inata do hospedeiro durante a fase inicial da infecção (GAZZINELLI & DENKERS, 2006; TARLETON, 2007; TRINCHIERI & SHER, 2007). Essas interações iniciais são críticas tanto para controlar a carga parasitária na fase inicial da infecção quanto para o estabelecimento de um microambiente rico em citocinas capazes de influenciar a direção e intensidade da resposta imune adaptativa subsequente, que é crucial para o controle da replicação do parasito, regulação da resposta inflamatória, manutenção da homeostase tecidual e sobrevivência do hospedeiro durante o curso da infecção (AKIRA *et al.*, 2001; GAZZINELLI & DENKERS, 2006; MEDZHITOV, 2008; KUMAR *et al.*, 2009).

#### I.5.1. Imunidade inata na infecção por *Trypanosoma cruzi*

O estudo da imunidade inata, a primeira linha de defesa do organismo, vem revolucionando nossa compreensão dos mecanismos de defesa ativados na fase inicial da infecção por *T. cruzi*. A imunidade inata é prontamente ativada através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (*PAMPs: pathogen associated molecular patterns*), que são essenciais para a sobrevivência do agente infeccioso (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002; AKIRA *et al.*, 2006; MEDZHITOV, 2008; KUMAR *et al.*, 2009). Além disso, mecanismos da imunidade inata também podem ser ativados por sinais de

estresse ou perigo endógenos designados padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs: *danger-associated molecular patterns*), tais como ácido úrico, proteínas de choque térmico (HSPs: *Heat shock proteins*) e trifosfato de adenosina (ATP) liberados no meio intersticial após a lise celular (MATZINGER, 2002a; HEATH & CARBONE, 2003; MEDZHITOV, 2008). A ativação de mecanismos efetores da imunidade inata depende da expressão de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs: *pattern recognition receptors*), que permitem a detecção de múltiplas classes de patógenos, através do reconhecimento de PAMPs específicos. Entre os PRRs se destacam os receptores semelhantes a *Toll* (TLRs: *Toll-like receptors*), que são receptores evolucionariamente conservados expressos por diferentes tipos de células em mamíferos (AKIRA *et al.*, 2006; CREAGH & O'NEILL, 2006; KAWAI & AKIRA, 2009; KUMAR *et al.*, 2009). A interação PRRs-PAMPs é crucial para ativar vias de sinalização intracelulares necessárias à ativação da imunidade inata e indução de uma resposta inflamatória local, caracterizada pela mobilização coordenada de proteínas plasmáticas e leucócitos para o sítio de infecção, o que é essencial para controlar a proliferação e disseminação de várias classes de agentes infecciosos, inclusive *T. cruzi* (AKIRA *et al.*, 2001; JANEWAY & MEDZHITOV, 2002; AKIRA *et al.*, 2006; FRITZ *et al.*, 2006; SAVINO *et al.*, 2007; TARLETON, 2007; MEDZHITOV, 2008; KUMAR *et al.*, 2009). De fato, a infecção por *T. cruzi* em camundongos com *background* genético de C57BL/6 deficientes para a molécula adaptadora MyD88 (*Myeloid Differentiation Factor 88*), um componente crítico na via de sinalização de vários TLRs, resulta em bloqueio da produção de citocinas pró-inflamatórias, aumento da carga parasitária e taxa de mortalidade em relação a animais normais (FIG. 4). Esses resultados demonstram que antígenos derivados de parasito são eficientemente reconhecidos por células do hospedeiro expressando TLRs e que a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida pela ativação desses receptores é essencial para a defesa e sobrevivência do hospedeiro (CAMPOS *et al.*, 2004).

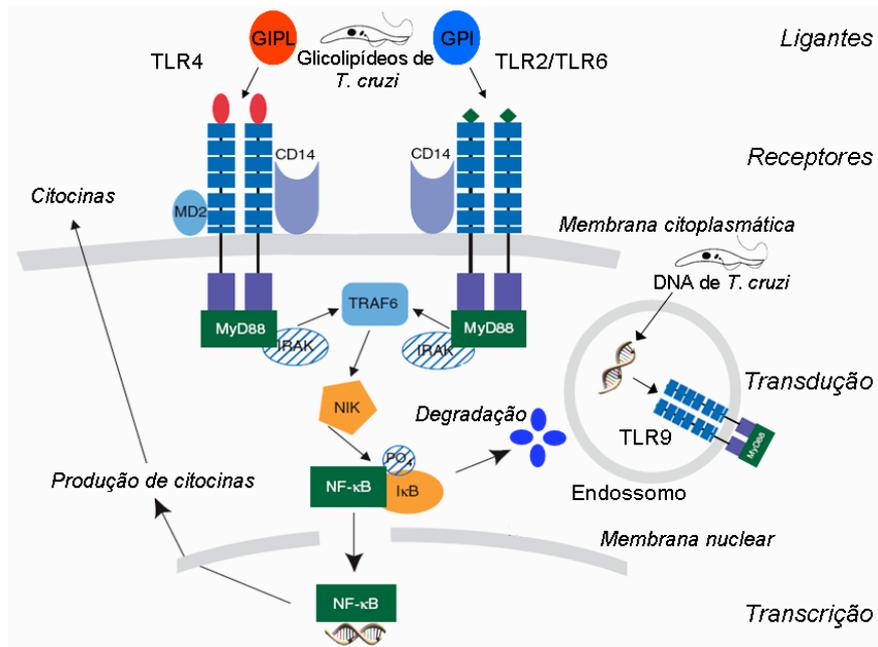


FIGURA 4 - Agonistas de TLRs derivados de *T. cruzi* são capazes de ativar vias de sinalização intracelulares que levam à produção de citocinas pró-inflamatórias por células da imunidade inata do hospedeiro. As âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) derivadas de glicoproteínas semelhantes à mucina e glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs), os principais glicoconjugados presentes na membrana citoplasmática de *T. cruzi*, bem como o DNA do parasito contendo motivos CpG não-metilados são potentes agonistas de TLRs (TLR2/6, TLR4 ou TLR9) capazes de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias por células da imunidade inata. Brevemente, a interação entre ligante-receptor induz a formação do complexo formado pela molécula adaptadora MyD88 e pela proteína cinase IRAK, que ativa a proteína cinase NIK, em um passo depende de TRAF6. A proteína cinase NIK promove a liberação da subunidade IκB do fator de transcrição NF-κB. A translocação do fator NF-κB para o núcleo induz um aumento na expressão de vários genes alvo que codificam citocinas pró-inflamatórias, as quais são secretadas pela célula após o processo de tradução que ocorre no citoplasma.

Entre as moléculas derivadas de *T. cruzi*, capazes de ativar mecanismos efetores da imunidade inata do hospedeiro, estão as âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) derivadas de glicoproteínas semelhantes à mucina e glicoinositolfosfolípídeos (GIPLs), bem como o próprio DNA do parasito contendo motivos CpG não-metilados, que são capazes de interagir com diferentes TLRs e induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias por células efetoras da imunidade inata (CAMPOS *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2002; CAMPOS & GAZZINELLI, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2004; BAFICA *et al.*, 2006; GAZZINELLI & DENKERS, 2006; KUMAR *et al.*, 2009).

Como discutido anteriormente, o microambiente rico em citocinas estabelecido através da ativação de mecanismos efetores da imunidade inata é capaz de influenciar a resposta imune adaptativa subsequente, que é essencial para a manutenção do controle da infecção, regulação da resposta inflamatória, manutenção da homeostase tecidual e sobrevivência do hospedeiro durante o curso da infecção. O reconhecimento inicial de agentes infecciosos é feito principalmente por células residentes nos tecidos, o que desencadeia a produção não apenas de citocinas, mas de vários outros mediadores inflamatórios, tais como: quimiocinas, aminas vasoativas, eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos), enzimas, proteases, espécies reativas de oxigênio e intermediários reativos de nitrogênio, bem como produtos de cascatas proteolíticas (AKIRA *et al.*, 2001; JANEWAY & MEDZHITOV, 2002; MATZINGER, 2002b; SAVINO *et al.*, 2007; TARLETON, 2007; MEDZHITOV, 2008; KUMAR *et al.*, 2009). O principal efeito imediato desses mediadores é desencadear uma resposta inflamatória local, a qual envolve um vasto número de componentes celulares e moleculares. No sítio inflamatório, a tradução de sinais extracelulares em respostas celulares resulta de uma complexa integração de diferentes vias intracelulares de transdução de sinais. Complexidade adicional emerge do fato de que um único mediador inflamatório, liberado no meio extracelular em resposta à infecção, pode influenciar tanto vias pró- quanto anti-inflamatórias

em diferentes células alvo, o que pode influenciar direta ou indiretamente a qualidade, intensidade e duração da resposta imune adaptativa subsequente (AKIRA *et al.*, 2001; GAZZINELLI & DENKERS, 2006; MEDZHITOV, 2008; KUMAR *et al.*, 2009).

A resposta inflamatória tem um papel crucial e amplamente reconhecido na proteção contra agentes infecciosos, mas sob certas circunstâncias pode também apresentar efeitos colaterais potencialmente fatais para o organismo, como observado no contexto de várias doenças infecciosas, autoimunes e alérgicas. Portanto, a fim de prevenir possíveis efeitos patológicos, a resposta inflamatória deve ser finamente regulada. A manutenção de vias de sinalização e comunicação intercelulares altamente coordenadas no sistema imune, bem como entre o sistema imune e outros sistemas orgânicos é crucial para a manutenção e regulação da atividade imunológica. Um dos principais mecanismos de comunicação intercelular envolve a secreção de fatores solúveis, tais como citocinas, que são capazes de regular a qualidade, intensidade e duração de todas as respostas inflamatórias. Nesse contexto, a ativação do endotélio vascular, induzida por mediadores inflamatórios liberados nos sítios inflamatórios, é um dos eventos mais importantes da inflamação, pois tanto o extravasamento de proteínas plasmáticas quanto o recrutamento seletivo de leucócitos circulantes ocorre nas vênulas de endotélio alto (HEV: *High endothelial venule*). O extravasamento de proteínas plasmáticas para o meio intersticial forma uma matriz provisória, que permite a migração de leucócitos recrutados, os quais podem ser ativados por contato direto com o agente infeccioso ou por mediadores inflamatórios produzidos por células residentes. Na fase inicial da infecção, células efetoras da imunidade inata, tais como neutrófilos, monócitos, macrófagos, mastócitos células dendríticas e células NK, detectam o agente infeccioso e tentam destruí-lo. Por outro lado, substâncias efetoras produzidas por células efetoras da imunidade inata, tais como: radicais livres e proteases (proteínases, catepsinas e elastases), são incapazes de diferenciar entre componentes presentes em agentes infecciosos e no hospedeiro, o que torna inevitável a

geração de danos contra alvos do próprio hospedeiro. Uma resposta imune inata bem sucedida na fase inicial da infecção normalmente resulta na eliminação do agente infeccioso seguida por uma fase de resolução/reparo, mediada principalmente por macrófagos. Entretanto, se a imunidade inata falha em eliminar o agente infeccioso, o processo persiste e adquire novas características: o infiltrado inflamatório passa a apresentar um predomínio de células mononucleares, principalmente macrófagos e linfócitos. Se o recrutamento dessas células não for suficiente para controlar a infecção e eliminar o agente infeccioso, uma resposta inflamatória crônica se instala e pode desencadear danos teciduais progressivos e irreversíveis, que podem levar a mau funcionamento de vários órgãos e com isso comprometer a sobrevivência do hospedeiro (MEDZHITOV, 2008).

Embora a fase aguda da infecção por *T. cruzi* seja caracterizada por elevada carga parasitária, a maioria dos indivíduos infectados não apresenta manifestações clínicas características da DC, o que dificulta o diagnóstico precoce e tratamento da doença. O fato da maioria dos casos de DC ser diagnosticada na fase crônica da doença representa um enorme obstáculo para a compreensão do papel da resposta imune contra o parasito durante a fase inicial da infecção. Por isso, a fase aguda da DC tem sido estudada principalmente em modelos experimentais, em particular o murino. A resistência do hospedeiro na fase inicial da infecção por *T. cruzi* depende da ativação de células efetoras da imunidade inata e produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , bem como de intermediários reativos de nitrogênio (GOLGHER & GAZZINELLI, 2004). Entre as células efetoras da imunidade inata destacam-se macrófagos, células dendríticas e células NK, os quais são essenciais para o controle da replicação do parasito, especialmente durante a fase inicial da infecção (FIG.5).

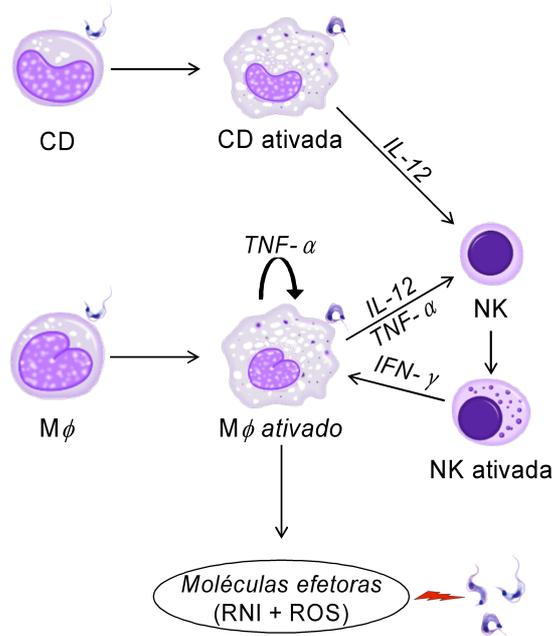


FIGURA 5 - Imunidade inata durante a fase aguda inicial da infecção por *Trypanosoma cruzi*. Na fase aguda inicial da infecção por *T. cruzi*, a resposta imune inata, a primeira linha de defesa do hospedeiro, representa um papel crítico na resistência à infecção. Células da imunidade inata, tais como macrófagos ( $M\phi$ ), células dendríticas (CDs) e células NK, são ativadas por moléculas derivadas do parasito, o que induz a produção de vários mediadores pró-inflamatórios, tais como citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNI), que são essenciais para controlar a replicação do parasito. Além disso, a ativação de células efetoras da imunidade inata, principalmente as CDs, que fazem a ligação entre as imunidades inata e adaptativa, como discutido no item I.5.2.

A atividade tripanocida de macrófagos ativados pela via clássica, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, é modulada por uma complexa rede de interações envolvendo antígenos do parasito, outras células efetoras da imunidade inata, vários mediadores inflamatórios, bem como componentes da matriz extracelular (NOËL *et al.*, 2004; RAES *et al.*, 2007). Na fase inicial da infecção por *T. cruzi*, a IL-12 produzida por macrófagos ativados pela via clássica, após o reconhecimento de moléculas derivadas do parasito, é capaz de induzir a produção de IFN- $\gamma$  por células NK. De fato, a administração de IL-12 recombinante aumenta a resistência à infecção por *T. cruzi*, enquanto a neutralização do IFN- $\gamma$  endógeno resulta num drástico aumento na carga parasitária e taxa de mortalidade durante a fase aguda da infecção (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996; HUNTER *et al.*, 1996). O IFN- $\gamma$  produzido por células NK estimula a produção de vários outros mediadores pró-inflamatórios por macrófagos, tais como o TNF- $\alpha$ , que junto com IFN- $\gamma$  induz um aumento da expressão da sintase do óxido nítrico induzível (iNOS), o que resulta em elevação da produção de intermediários reativos de nitrogênio (NO) e conseqüentemente da atividade tripanocida de macrófagos, que é essencial para o controle da infecção por *T. cruzi* (VESPA *et al.*, 1994; HÖLSCHER *et al.*, 1998; BOGDAN *et al.*, 2000; GUTIERREZ *et al.*, 2009). A infecção de camundongos deficientes em células NK com *T. cruzi* resulta em elevada carga parasitária e alta taxa de mortalidade (KORBEL *et al.*, 2004). Além disso, o bloqueio da via de produção de NO por inibidores da iNOS em camundongos infectados com *T. cruzi* leva à exacerbação da doença (SAEFTEL *et al.*, 2001). É importante ressaltar que o NO pode reagir com o radical superóxido ( $O_2^-$ ) gerando peroxinitrito (ONOO $^-$ ), uma substância tóxica mais potente que seus precursores, capaz de provocar dano oxidativo em vários alvos moleculares tanto do parasito quanto do próprio hospedeiro (DONIZETTE-MALVEZI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2007; GUTIERREZ *et al.*, 2009).

O circuito de ativação, envolvendo macrófagos e células NK, é crítico principalmente na fase inicial da infecção por *T. cruzi*, ou seja, na ausência de células efetoras da imunidade adaptativa (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996; CARDILLO *et al.*, 1996; GAZZINELLI *et al.*, 2004; NOËL *et al.*, 2004; GAZZINELLI & DENKERS, 2006). Entretanto, dependendo de fatores inerentes ao parasito e hospedeiro, uma resposta imune anti-inflamatória, caracterizada pela produção de citocinas Th2, tais como: IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$  pode ser induzida (NOËL *et al.*, 2004; RAES *et al.*, 2007). A intensidade relativa da resposta Th2 quando comparada à resposta Th1 pode afetar a evolução clínica da doença e conseqüentemente a sobrevivência do hospedeiro durante o curso da infecção. Citocinas Th2, tais como: IL-4, IL-10 e IL-13, são capazes de inibir a atividade microbicida de macrófagos ativados pela via clássica, tanto através da supressão da produção de intermediários reativos de nitrogênio quanto através da ativação de uma via metabólica alternativa catalisada pela arginase-1 que depleta L-arginina, que é essencial para a produção de NO (NOËL *et al.*, 2004; RAES *et al.*, 2007). De fato, camundongos da linhagem BALB/c infectados com a cepa Colombina de *T. cruzi* desenvolvem uma resposta imune Th2 contra o parasito e não sobrevivem à fase aguda da infecção. Por outro lado, camundongos BALB/c deficientes em IL-4 são resistentes à infecção com *T. cruzi* (MICHAILOWSKY *et al.*, 2001). Entretanto, não foi determinado se a ativação diferencial de macrófagos está diretamente envolvida na susceptibilidade diferencial dessas linhagens de camundongos à infecção com *T. cruzi*. Além das citocinas, outros fatores, tais como: complexos imunes e células apoptóticas, gerados durante o curso da infecção por *T. cruzi*, são capazes de influenciar o perfil de ativação de macrófagos e com isso influenciar a evolução clínica da doença. De fato, no contexto da infecção por *T. cruzi*, a fagocitose de células apoptóticas pode induzir a ativação de macrófagos pela via alternativa, o que favorece tanto a sobrevivência quanto a replicação do parasito (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000). No modelo de leishmaniose experimental, a

ativação diferencial de macrófagos determina a susceptibilidade ou resistência durante a fase aguda da infecção. No contexto da infecção por *L. major* em camundongos BALB/c, a fagocitose de neutrófilos mortos induz a produção de TGF- $\beta$  por macrófagos ativados pela via alternativa favorecendo a replicação do parasito. Por outro lado, na infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6, a fagocitose de neutrófilos mortos induz a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos ativados pela via clássica, o que é essencial para controlar a infecção (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004). Portanto, no contexto da infecção por várias espécies de protozoários, inclusive *T. cruzi*, o estabelecimento de um microambiente rico em citocinas Th1 é crucial para o controle da infecção e sobrevivência do hospedeiro na fase inicial da infecção.

A cascata inflamatória do complemento, um componente filogeneticamente muito antigo da imunidade inata, é crucial para a defesa do hospedeiro durante o curso da infecção por vários agentes infecciosos, inclusive *T. cruzi* (GASQUE, 2004). Formas epimastigotas do parasito são capazes de induzir prontamente a ativação da cascata do complemento, o que é suficiente para eliminá-las. Entretanto, formas tripomastigotas do parasito expressam uma glicoproteína semelhante ao fator acelerador de decaimento (DAF: *decay-accelerating factor*) humano em sua superfície, o que as torna capazes de inibir a via alternativa de ativação do complemento bloqueando sua ação lítica (SACKS & SHER, 2002). Além disso, a infecção por *T. cruzi* induz a produção de proteínas de fase aguda, entre as quais a proteína C reativa, a proteína amilóide P e a  $\alpha$ -2 macroglobulina (SOEIRO *et al.*, 2000). Complexos imunes cruzipáina- $\alpha$ -2 macroglobulina são endocitados com maior eficiência por monócitos, o que resulta em aumento na apresentação de peptídeos provenientes do processamento da cruzipáina para células T CD4 provenientes de pacientes chagásicos (MORROT *et al.*, 1997). Exceto por esse achado, o papel das proteínas de fase aguda na patogênese da DC ainda permanece desconhecido.

### I.5.2. Imunidade adaptativa na infecção por *Trypanosoma cruzi*

A resposta imune adaptativa anti-*T. cruzi* é induzida mais tardiamente e influenciada por mediadores inflamatórios produzidos na fase inicial da infecção. No contexto da DC, a ativação de células T auxiliares CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  (Th1) é essencial para o controle da replicação de *T. cruzi* na fase tardia da infecção, pois o IFN- $\gamma$  promove o aumento da atividade tripanocida de macrófagos e é crucial para a ativação de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas (Tc1) capazes de lisar células infectadas pelo parasito. Além disso, a produção de IFN- $\gamma$  por células Th1 é crucial para a diferenciação de células B em plasmócitos produtores de anticorpos líticos (IgG) capazes de matar formas tripomastigotas circulantes do parasito, através da ativação da cascata do complemento pela via clássica (FIG. 6). De fato, camundongos deficientes em células T CD4<sup>+</sup> e/ou T CD8<sup>+</sup>, embora possuam imunidade inata normal, apresentam alta carga parasitária e elevada taxa de mortalidade em relação a animais normais, o que mostra a importância de ambas as populações de linfócitos no controle da infecção durante a evolução clínica da doença (TARLETON, 1990; ROTTENBERG *et al.*, 1993; ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996; TARLETON *et al.*, 1996). Embora citocinas produzidas por células efectoras tanto da imunidade inata quanto adaptativa desempenhem um papel crítico na regulação da atividade imunológica e resistência à infecção por *T. cruzi*, nenhuma polarização Th1 *versus* Th2 clara tem sido observada no contexto da infecção experimental por *T. cruzi*.

Experimentalmente, várias linhas de evidência sugerem que camundongos C57BL/6 são mais resistentes em relação a camundongos BALB/c contra vários agentes patogênicos, inclusive *T. cruzi* (WRIGHTSMAN *et al.*, 1982; HEINZEL *et al.*, 1998; SACKS & NOBENTRAUTH, 2002; DULEU *et al.*, 2004; ROQUE *et al.*, 2007).

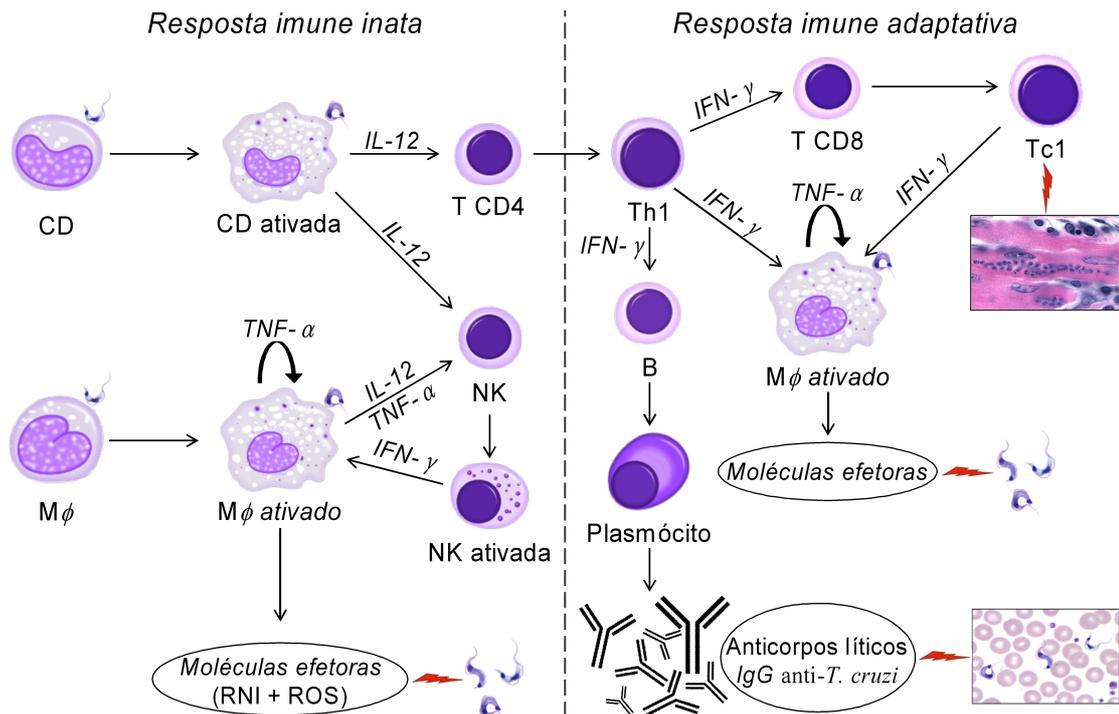


FIGURA 6 - Imunidades inata e adaptativa durante a fase aguda da infecção por *Trypanosoma cruzi*. Na fase inicial da infecção por *T. cruzi*, a resposta imune inata, a primeira linha de defesa do hospedeiro, representa um papel crítico na resistência à infecção. Células da imunidade inata, tais como macrófagos ( $M\phi$ s), células dendríticas (CDs) e células NK, são ativadas por moléculas derivadas do parasito, o que induz a produção de vários mediadores pró-inflamatórios, tais como citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNI), que são capazes de controlar a replicação do parasito. Além disso, a ativação de células efetoras da imunidade inata, principalmente as CDs, que fazem a ligação entre as imunidades inata e adaptativa, através da produção de citocinas essenciais para a diferenciação e expansão clonal de células T auxiliares  $CD4^+$  (Th1) e T citotóxicas  $CD8^+$  (Tc1), que são mais eficientes no controle da infecção. A ativação de células Th1 produtoras de  $IFN-\gamma$  é essencial para o controle da replicação de *T. cruzi*, pois o  $IFN-\gamma$  promove o aumento da atividade tripanocida de macrófagos e a ativação de células T  $CD8$  citotóxicas, que são capazes de lisar células infectadas pelo parasito. Além disso, a produção de  $IFN-\gamma$  por células Th1 é crucial para a diferenciação de células B em plasmócitos, que secretam anticorpos líticos (IgG) capazes de matar formas tripomastigotas circulantes do parasito, através da ativação da cascata do complemento pela via clássica.

A susceptibilidade diferencial de diferentes linhagens de camundongos à infecção por *T. cruzi* tem sido correlacionada à produção de citocinas (IL-4, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ), expressão de iNOS e arginase-1 (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996; ABRAHAMSOHN, 1998; NOËL *et al.*, 2004; RAES *et al.*, 2007). Roggero *et al.* (2002) observaram altas taxas de mortalidade entre camundongos C57BL/6 em relação a camundongos BALB/c infectados com a cepa Tulahuén de *T. cruzi*. A infecção de animais C57BL/6 resultou em manifestações clínicas mais graves e elevada taxa de mortalidade em relação a animais BALB/c, o que não pode ser associado à carga parasitária, mas a uma resposta imune desbalanceada, caracterizada por altos níveis sistêmicos de TNF- $\alpha$  e baixos de IL-10 entre animais C57BL/6 em relação a camundongos BALB/c (ROGGERO *et al.*, 2002). De fato, vários trabalhos mostram claramente os efeitos deletérios do TNF- $\alpha$  tanto durante a evolução clínica da DC quanto em modelos experimentais da doença (BILATE *et al.*, 1998). Por outro lado, enquanto camundongos C57BL/6 normais sobrevivem à infecção com a cepa Tulahuén de *T. cruzi*, a infecção de camundongos deficientes em IL-10 com *background* genético de C57BL/6 resulta em redução da parasitemia, aumento nos níveis sistêmicos de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ ) e intermediários reativos de nitrogênio, bem como manifestações clínicas de toxemia e alta taxa de mortalidade (HÖLSCHER *et al.*, 2000), o que mostra que a IL-10 tem um papel crítico no contexto da infecção por *T. cruzi*. Citocinas pró-inflamatórias, tais como: IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , têm funções amplamente reconhecidas na proteção contra *T. cruzi*, mas quando liberadas sistemicamente podem apresentar efeitos colaterais potencialmente fatais para o hospedeiro durante o curso da infecção (TRUYENS *et al.*, 1995; ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996; CASTAÑOS-VELEZ *et al.*, 1998; HÖLSCHER *et al.*, 2000; GONI *et al.*, 2002). De fato, a liberação intensa de mediadores pró-inflamatórios sistemicamente pode manifestar-se clinicamente como uma síndrome semelhante ao choque tóxico, comumente observado durante o curso da

infecção por várias classes de agentes patogênicos, tais como: vírus, bactérias, fungos e protozoários. De um modo geral, a infecção por diferentes classes de patógenos inicialmente induz uma elevação nos níveis circulantes de mediadores pró-inflamatórios, mas se a resposta pró-inflamatória sistêmica persiste, há uma mudança para um estado de imunossupressão devido à liberação de potentes mediadores anti-inflamatórios, o que pode levar à perda da hipersensibilidade tardia, incapacidade de controlar a infecção e predisposição a infecções oportunistas (HOTCHKISS & KARL, 2003). De fato, Hölscher *et al.* (2000) mostraram que a infecção de camundongos com *background* genético de C57BL/6 deficientes em IL-10 com *T.cruzi* desencadeia uma resposta inflamatória sistêmica semelhante ao choque tóxico, caracterizada por perda significativa de massa corporal, hipotermia, hipoglicemia, hipercalemia, coagulação intravascular, bem como hemorragia hepática e pulmonar. Além disso, foi observada uma forte correlação negativa entre os níveis sistêmicos de TNF- $\alpha$  e o tempo de morte entre animais deficientes em IL-10 infectados com *T. cruzi* (HÖLSCHER *et al.*, 2000). O TNF- $\alpha$  é um marcador bem conhecido da sepse e um dos principais mediadores inflamatórios com múltiplas ações deletérias bem conhecidas no contexto de várias doenças infecciosas. De fato, a neutralização de TNF- $\alpha$  através da administração de anti-TNF- $\alpha$  foi suficiente para atenuar a progressão da doença e prolongar a sobrevivência de camundongos C57BL/6 deficientes em IL-10 infectados com *T. cruzi* (HÖLSCHER *et al.*, 2000). Além disso, estudos mostram que a manutenção do balanço entre os níveis de TNF- $\alpha$  e receptores solúveis de TNF- $\alpha$  (sTNFR I e sTNFR II) é capaz de modular a caquexia e a mortalidade entre camundongos infectados com *T. cruzi* (TRUYENS *et al.*, 1999; ROGGERO *et al.*, 2002).

A disseminação sistêmica de *T. cruzi* é acompanhada por uma intensa resposta imune potencialmente capaz de eliminar o parasito durante o curso da infecção. Entretanto, o parasito normalmente persiste no hospedeiro, um fenômeno que no contexto de outras infecções parasitárias tem sido atribuído à atividade de células reguladoras T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>.

Atualmente, é bem aceito que a indução de uma resposta imune Th1 é essencial para o controle da infecção por *T. cruzi*, mas a regulação da resposta inflamatória desencadeada pela infecção, através da produção de mediadores anti-inflamatórios também é crucial para a sobrevivência do hospedeiro durante a evolução clínica da doença. Nesse contexto, a IL-10 tem emergido como uma citocina essencial na regulação da resposta imune contra várias classes de agentes infecciosos, devido à sua capacidade de contrabalancear os efeitos colaterais potencialmente fatais de mediadores pró-inflamatórios, tais como o IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , produzidos por células Th1 (COUPER *et al.*, 2008). Entretanto, a atenuação da resposta Th1 por mediadores anti-inflamatórios pode comprometer o controle da infecção e resultar na persistência do parasito. Portanto, a regulação da produção de mediadores inflamatórios é crucial tanto para controlar a infecção por *T. cruzi* quanto para prevenir efeitos colaterais potencialmente fatais para o hospedeiro desencadeados pela intensa produção de mediadores pró-inflamatórios durante o curso da infecção (HÖLSCHER *et al.*, 2000). Em relação ao papel de células reguladoras T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> no contexto da infecção por *T. cruzi* há certa controvérsia na literatura científica. Alguns trabalhos sugerem que a expansão de células reguladoras T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> durante a fase crônica da DC possa representar um importante mecanismo capaz de atenuar o dano tecidual desencadeado pela resposta inflamatória desencadeada pela infecção (SATHLER-AVELAR *et al.*, 2009). Porém, outras linhas de evidência obtidas através da depleção de células reguladoras T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> com anticorpos monoclonais (mAbs: *monoclonal antibodies*) anti-CD-25, sugerem que essa população de células T CD4<sup>+</sup> tem apenas um papel limitado na resistência do hospedeiro durante o curso da infecção por *T. cruzi* (KOTNER & TARLETON, 2007; SALES *et al.*, 2008). Entretanto, é importante lembrar que a IL-10 pode ser produzida por diferentes tipos celulares, não apenas por células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> e as principais fontes podem variar entre diferentes tecidos ou durante a evolução clínica da doença (COUPER *et al.*, 2008).

## II. JUSTIFICATIVA

Em relação à patogênese da doença de Chagas (DC) vários aspectos ainda precisam ser investigados com maior profundidade, entre os quais está o papel da complexidade clonal da população de *T. cruzi* infectante na evolução clínica da doença. Populações naturais do parasito apresentam uma ampla e bem caracterizada diversidade genética intra-específica com uma variabilidade correspondente em várias propriedades biológicas, entre as quais: infectividade, taxa de replicação, susceptibilidade a drogas, tropismo tecidual, virulência e patogenicidade (MACEDO & PENA, 1998; MACEDO *et al.*, 2004; DUTRA & GOLLOB, 2008; DUTRA *et al.*, 2009). Além disso, *T. cruzi* apresenta uma estrutura populacional predominantemente clonal e a existência de infecções concomitantes envolvendo diferentes clones do parasito (*da mesma linhagem ou não*) tem sido observada naturalmente tanto em hospedeiros invertebrados quanto em vertebrados, inclusive humanos (TIBAYRENC *et al.*, 1985; TIBAYRENC *et al.*, 1986; VAGO *et al.*, 2000; STEINDEL *et al.*, 2008; MANTILLA *et al.*, 2010). Entretanto, a maioria dos modelos experimentais da DC envolve infecções com uma única população do parasito. Os poucos estudos disponíveis na literatura científica, envolvendo infecções concomitantes com diferentes populações de *T. cruzi*, foram conduzidos em camundongos BALB/c ou ratos Holtzman (ANDRADE *et al.*, 1999; DE LANA *et al.*, 2000; FRANCO *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2007) e sugerem fortemente que a complexidade clonal da população de *T. cruzi* infectante representa um importante fator potencialmente capaz de influenciar a evolução clínica da doença. Franco *et al.* (2003) mostraram que a infecção de ratos Holtzman com JG (*Tc II*) desencadeia miocardite moderada com mortalidade nula, enquanto a infecção com CL Brener (*Tc VI*) induz miocardite difusa grave com alta taxa de mortalidade durante a fase aguda da infecção. Por outro lado, a coinfeção com JG e CL Brener resulta em um padrão de miocardite

semelhante àquele observado entre animais infectados apenas com JG e redução significativa da taxa de mortalidade. Além disso, Franco *et al.* (2003) observaram a substituição progressiva de CL Brener por JG na maioria das amostras de tecido provenientes de diferentes órgãos de um mesmo animal coinfestado com JG e CL Brener durante o curso da infecção. De fato, ao final da fase aguda, apenas JG foi detectado por PCR na maioria das amostras de tecido analisadas, inclusive tecido cardíaco, o que sugere que CL Brener foi eliminado ou reduzido a níveis indetectáveis durante o curso da infecção, o que constitui uma importante evidência para o papel da variabilidade genética do parasito na patogênese da doença induzida pela infecção por *T. cruzi* (FRANCO *et al.*, 2003). Entretanto, o mecanismo envolvido na proteção de ratos Holtzman pela coinfecção com JG e CL Brener não foi elucidado por Franco *et al.*, (2003). Portanto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de investigar com maior profundidade os efeitos da associação de *JG* e *CL Brener* em camundongos *BALB/c* através da análise simultânea de múltiplos parâmetros biológicos, visando esclarecer os mecanismos patogênicos envolvidos nas diferentes manifestações clínicas da doença, durante a fase aguda da infecção.

### *III. OBJETIVOS*

#### *III.1. Objetivo geral*

Avaliar os efeitos da associação de duas populações de *T. cruzi* com diferentes graus de virulência e patogenicidade em camundongos BALB/c, através da análise simultânea de múltiplos parâmetros biológicos durante a fase aguda da infecção.

#### *III.2. Objetivos específicos*

III.2.1. Avaliar os efeitos da associação de JG e CL Brener na evolução da parasitemia, massa corporal e sobrevivência durante a fase aguda da infecção;

III.2.2. Avaliar os efeitos da associação de JG e CL Brener em vários parâmetros hematológicos em 7, 14 e 21 dias após a infecção;

III.2.3. Avaliar os efeitos da associação de JG e CL Brener na intensidade da miocardite e parasitismo cardíaco em 7, 14 e 21 dias após a infecção;

III.2.4. Avaliar os efeitos da associação de JG e CL Brener no tropismo das respectivas populações de *T. cruzi* para o tecido cardíaco em 7, 14 e 21 dias após a infecção;

III.2.5. Avaliar os efeitos da associação de JG e CL Brener nos níveis séricos de citocinas e óxido nítrico em 7, 14 e 21 dias após a infecção;

III.2.6. Avaliar os efeitos da associação de JG e CL Brener no perfil fenotípico e funcional de células esplênicas em 7, 14 e 21 dias após a infecção.

## IV. METODOLOGIA

### IV.1. Linhagens de camundongos

Nesse estudo foram utilizados camundongos *Swiss* e *BALB/c* machos, com 6 a 8 semanas e massa corporal em torno de 20 g. Camundongos *Swiss* foram usados apenas para a manutenção das populações de *T. cruzi* (*JG* e *CL Brener*) usadas na realização desse trabalho. Camundongos *BALB/c* foram usados para avaliar os efeitos da associação de *JG* e *CL Brener*, através da análise simultânea de múltiplos parâmetros biológicos durante a fase aguda da infecção. Os animais foram fornecidos pelos Centros de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) ou Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) e mantidos com ração padrão para camundongos, água filtrada *ad libitum* e ciclo de luz de 12 h. Todos os procedimentos, que envolveram a utilização de animais, foram feitos de acordo com as regras estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG.

### IV.2. Populações de *Trypanosoma cruzi*

Nesse trabalho foram usadas duas populações de *T. cruzi* (*JG* e *CL Brener*) com virulência e patogenicidade opostas em camundongos. A cepa *JG* (*Tc II*) foi isolada de um paciente chagásico com megaesôfago e apresenta baixa virulência e patogenicidade em camundongos *BALB/c*. O clone *CL Brener* (*Tc VI*) foi obtido a partir da cepa *CL*, originalmente isolada de um espécime de *T. infestans*, e apresenta alta virulência e patogenicidade em camundongos *BALB/c*. Ambas as populações de *T. cruzi* foram fornecidas pelo Laboratório de Biologia do *Trypanosoma cruzi* do Depto. de Parasitologia do ICB e mantidas através da inoculação por via intraperitoneal (*i.p.*) de formas tripomastigotas

sanguíneas de cada população do parasito em camundongos *Swiss* em intervalos de duas semanas, bem como através do cultivo de formas epimastigotas em meio LIT (*Liver Infusion Triptose*). A genotipagem de ambas as populações de *T. cruzi* foi feita através da avaliação de diferentes marcadores moleculares nucleares, bem como de um marcador molecular mitocondrial (TAB. 2), antes de iniciar as infecções experimentais. Para isso, camundongos *Swiss* infectados com *JG* ou *CL Brener* foram sacrificados 14 dias após a infecção, fragmentos de tecido cardíaco foram coletados e submetidos ao protocolo de lise alcalina para obtenção de amostras de DNA total. As amostras de DNA foram submetidas a ensaio de PCR para a genotipagem de sete locos de microssatélites polimórficos (*MCLE01*, *MCLF10*, *SCLE10*, *SCLE11*, *TcAAAT6*, *TcTAC15* e *TcTAT20*) e do marcador *rDNA 24S $\alpha$* , bem como do gene que codifica a subunidade II da enzima mitocondrial citôcromo oxidase (*COII*), como previamente descrito (SOUTO *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1998; FREITAS *et al.*, 2006; VALADARES *et al.*, 2008).

TABELA 2 - Genotipagem das populações de *Trypanosoma cruzi*.

<i>Marcador molecular</i>	<i>JG (Tc II)</i>	<i>CL Brener (TcVI)</i>
<i>COII</i>	C	B
<i>rDNA 24S<math>\alpha</math></i>	1	1
<i>MCLE01</i>	134/136	130/130
<i>MCLF10</i>	182/182	182/194
<i>SCLE10</i>	273/273	237/275
<i>SCLE11</i>	145/149	153/153
<i>TcAAAT6*</i>	271/275	263/263
<i>TcTAC15</i>	99/99	129/141
<i>TcTAT20</i>	190/217	181/223

\*Loco usado para a genotipagem do parasito em amostras de tecido cardíaco provenientes de animais coinfectados com *JG* e *CL Brener*.

### IV.3. Infecções experimentais

Para as infecções experimentais, amostras de sangue foram obtidas do plexo retroorbital de camundongos *Swiss* infectados com *JG* ou *CL Brener*. As amostras foram misturadas à heparina. A seguir, 5,0 µl de cada amostra foi examinado entre lâmina e lamínula de 22 x 22 mm em microscópio óptico comum com objetiva de 40x. Formas tripomastigotas sanguíneas presentes em 50 campos foram contadas e o número de tripomastigotas/0,10 ml de sangue calculado multiplicando-se o número de tripomastigotas contadas por 1.400. A seguir, as amostras foram diluídas em meio LIT para uma concentração final de 100 tripomastigotas/0,10 ml. Para as infecções simples, 0,10 ml dessa suspensão, contendo 100 formas tripomastigotas de *JG* ou *CL Brener*, foi inoculado por via *i.p.* em camundongos BALB/c. Para as coinfeções, volumes iguais de cada uma das suspensões usadas para as infecções simples foram misturados e 0,10 ml foi inoculado por via *i.p.* imediatamente após o preparo da suspensão. Camundongos BALB/c não-infectados, com sexo, idade e massa corporal equivalentes foram usados como controle. Os grupos experimentais foram designados: *Normal* (animais não-infectados); *JG* (animais infectados com *JG*); *CL Brener* (animais infectados com *CL Brener*) e *JG + CL Brener* (animais coinfectados com *JG* e *CL Brener*); e consistiram em 3, 6 ou 12 animais/grupo. Foram realizados pelo menos dois experimentos independentes (FIG. 7).

### IV.4. Avaliação da evolução da parasitemia, massa corporal e sobrevivência

A avaliação da evolução da parasitemia, massa corporal e sobrevivência foi feita a fim de avaliar as possíveis repercussões sistêmicas da doença durante a fase aguda da infecção. A parasitemia foi avaliada em dias alternados a partir do quinto dia até 61 dias após a infecção, pelo método proposto por Brener, conforme descrito a seguir (BRENER, 1962).

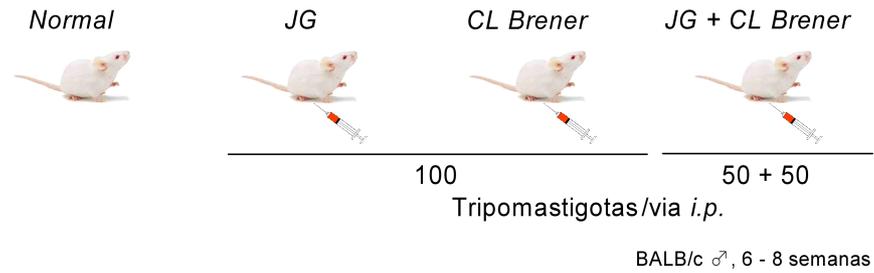


FIGURA 7 - Infecções experimentais. Camundongos *BALB/c* ♂, com 6 - 8 semanas e massa corporal em torno de 20 g foram infectados com 100 formas tripomastigotas de *JG* ou *CL Brener* por via i.p., para as infecções simples. Para a coinfeção, os animais foram inoculados com 50 formas tripomastigotas de cada população de *T. cruzi*. Camundongos *BALB/c* não-infectados, com sexo, idade e massa corporal equivalentes, foram usados como controle. Os grupos experimentais foram designados: *Normal* (animais não-infectados); *JG* (animais infectados com *JG*); *CL Brener*: (animais infectados com *CL Brener*) e *JG + CL Brener*: (animais coinfetados com *JG* e *CL Brener*); e consistiram em 3, 6 ou 12 animais. A avaliação da evolução da parasitemia, massa corporal e sobrevivência foi feita durante 61 dias após a infecção em dois experimentos independentes com n= 6 ou 12 animais/grupo. Alternativamente, os animais foram sacrificados em 7, 14 e 21 dias após a infecção para a obtenção das amostras biológicas (sangue, coração e baço) em dois experimentos independentes com n= 3 animais/grupo.

Brevemente, amostras de 5,0 µl de sangue coletadas através de secção da ponta da cauda de cada animal foram examinadas entre lâmina e lamínula de 22 x 22 mm em microscópio óptico comum com objetiva de 40x. A concentração de parasitos (número de tripomastigotas/ml) foi determinada multiplicando-se o número de formas tripomastigotas contadas em 50 campos microscópicos por 14.000. A avaliação da massa corporal foi feita em dias alternados a partir do dia 0 até 61 dias após a infecção e a mortalidade acompanhada diariamente. Além disso, manifestações clínicas típicas de doença (arrepimento de pêlos, anorexia, prostração e letargia) foram avaliadas durante o curso da infecção.

#### IV.5. Avaliação de parâmetros hematológicos

Em 7, 14 e 21 dias após a infecção, os animais foram anestesiados com solução anestésica contendo 2,0 mg/ml de *cloridrato de xilazina (Rompun)* e 10 mg/ml de *cloridrato de ketamina (Dopalen)*. Uma dose única de 0,10 ml da solução anestésica para cada 10 g de massa corporal foi administrada por via *i.p.*, as amostras de sangue periférico foram coletadas por secção do plexo axilar na presença ou não de anticoagulante e armazenadas a 8°C. Amostras coletadas na presença de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), um agente anticoagulante que preserva bem as características morfológicas dos elementos figurados do sangue, foram usadas para a realização do hemograma. A avaliação de vários parâmetros hematológicos, entre os quais: a contagem global de leucócitos, hemácias e plaquetas, bem como a determinação do valor hematócrito, concentração de hemoglobina e índices hematimétricos, foi feita no sistema automático *ABX Micros ABC Vet* (Horiba ABX diagnostics, Montpellier, France). A contagem diferencial de leucócitos foi feita sob imersão (100x) em esfregaços devidamente corados pelo método *May-Grünwald-Giemsa* (pelo menos 200 células foram contadas), o número absoluto de cada população de leucócito (linfócitos,

neutrófilos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos bastonetes) foi calculado e os resultados expressos por ml. As amostras coletadas sem anticoagulante foram centrifugadas a 1.000 rpm por 10 min para a obtenção das amostras de soro, que foram congeladas a -20°C para a dosagem de citocinas séricas e NO. Após a obtenção das amostras de sangue, os animais foram imediatamente sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos (baço e coração) coletados em condições estéreis em capela de fluxo laminar. Após a coleta, o baço de cada animal foi transferido para um tubo contendo 5,0 ml de meio RPMI (GIBCO, Grand Island, NY, USA) e a massa (mg) de cada órgão determinada em balança de precisão. A seguir, as amostras de baço foram mantidas a 8°C para a obtenção de suspensões de células esplênicas para as análises por citometria de fluxo, como descrito no item IV.10. O coração de cada animal foi cortado transversalmente, os fragmentos correspondentes à ponta de cada órgão foram imersos em etanol absoluto (Merck) e mantidos a 4°C para as análises moleculares por PCR; enquanto os fragmentos correspondentes à base de cada coração foram fixados por 24 h em solução tamponada de formaldeído a 4%, incluídos em parafina e cortados com 5,0 µm de espessura. A seguir, três secções semi-consecutivas foram coradas pela técnica de Hematoxilina & Eosina (H&E) como descrito no item IV.6.1 e usadas para a realização da análise histopatológica.

#### IV.6. Análise histopatológica (tecido cardíaco)

A análise histopatológica foi feita em amostras de tecido cardíaco coletadas em 7, 14 e 21 dias após a infecção. A avaliação da intensidade do parasitismo cardíaco foi feita através da contagem de ninhos de amastigotas presentes em três secções semi-consecutivas coradas por hematoxilina & eosina (H&E).

#### IV.6.1. Técnica de coloração por hematoxilina & eosina

A técnica de coloração por H&E foi utilizada para a análise qualitativa e quantitativa do infiltrado inflamatório cardíaco. Para isso, os fragmentos de tecido cardíaco coletados em 7, 14 e 21 dias após a infecção foram processados, incluídos em parafina e submetidos à microtomia. Três secções semi-consecutivas com 5,0  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidas e acondicionadas sobre lâmina de vidro. A seguir, as secções foram desparafinizadas em dois banhos de xilol durante 15 min, hidratadas em soluções de etanol com concentrações decrescentes (100, 90, 80 e 70%) por 3 min e lavadas em água corrente por 5 min. Os cortes foram corados pela hematoxilina de Harris por 50 s, lavados em água corrente por 20 min, e contra-corados pela eosina por 1 min e 30 s. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas em soluções de etanol com concentrações crescentes (70, 80, 90 e 100%) e diafanizadas em xilol. A seguir, as lâminas foram montadas com lamínulas de vidro e *Entellan* (Merck) e analisadas em microscópio óptico comum com objetivas de 10 e 40x. A análise qualitativa do infiltrado inflamatório cardíaco foi feita na parede livre do ventrículo direito próximo à junção atrial por patologista experiente e as alterações histopatológicas devidamente registradas.

#### IV.6.2. Análise quantitativa do infiltrado inflamatório cardíaco

A análise quantitativa do infiltrado inflamatório cardíaco foi feita em dez campos microscópicos escolhidos aleatoriamente e fotografados com objetiva de 40x em cada uma das 3 secções semi-consecutivas de tecido cardíaco coradas por H&E. As imagens foram capturadas com resolução de 1.392 x 1.040 *pixels* e transferidas, por meio de uma câmera de vídeo colorida *Cool SNAP-Procf Color* (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA), para um

sistema de vídeo acoplado a computador com o auxílio do programa *Image-Pro Express version 4.0 (Media Cybernetics)*. Após a calibração do sistema de captura, as imagens foram congeladas, armazenadas em um disco compacto e analisadas, no Laboratório de Morfometria do Depto. de Patologia Geral do ICB, com o programa de análise KS300 (Zeiss, Jena, Alemanha). As áreas nucleares de todas as células presentes em cada campo selecionado foram digitalizadas e automaticamente medidas em  $\mu\text{m}^2$ . A seguir, foi calculada a média aritmética das áreas nucleares para cada animal e os valores obtidos usados para comparar os grupos experimentais. A intensidade do parasitismo cardíaco foi estimada através da contagem de ninhos de amastigotas presentes em três secções semi-consecutivas de tecido cardíaco coradas por H&E em microscópio óptico comum com objetiva de 40x.

#### IV.7. Detecção e genotipagem do parasito por PCR em amostras de tecido cardíaco

A detecção do parasito em amostras de tecido cardíaco foi realizada através da amplificação do fragmento de ~330 pb correspondente à região polimórfica de moléculas de minicírculos do kDNA de *T. cruzi*, como previamente descrito (ANDRADE *et al.*, 1999) com algumas modificações. O kDNA, uma complexa rede de moléculas circulares de DNA extranuclear localizada próximo ao corpo basal do flagelo, corresponde ao DNA mitocondrial do parasito e é constituído por dezenas de moléculas de maxicírculos e milhares de moléculas de minicírculos, que são excelentes alvos tanto para a detecção quanto genotipagem do parasito. A genotipagem de *T. cruzi* em amostras de tecido cardíaco coletadas de animais coinfectados foi feita através da análise do loco de microssatélite polimórfico *TcAAAT6*, bem como através da análise de perfis de LSSP-PCR (*low stringency single primer-polymerase chain reaction*).

#### IV.7.1. Extração de DNA total de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Para a extração de DNA total do parasito, suspensões com  $10^8$  formas epimastigotas de JG ou CL Brener foram centrifugadas a 2.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em PBS estéril. O processo foi repetido três vezes e as células ressuspensas em 100  $\mu$ l de solução de lise (80 mM NaCl, 45 mM EDTA pH 8, 1% SDS e 100  $\mu$ g/ml proteinase K) e mantidas à 37°C durante a noite. A extração de DNA total foi feita pelo método do fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (MACEDO *et al.*, 1993). Após a extração, as amostras de DNA foram precipitadas com etanol absoluto à -70°C por 30 min e centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min à 4°C. O precipitado foi ressuspenso, com metade do volume inicial, em solução de ribonuclease (80 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8 e 70  $\mu$ g/ml ribonuclease A) e mantido à 37°C por 2 h. Uma nova extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico foi feita e as amostras precipitadas novamente com etanol absoluto à -70°C por 30 min. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min à 4°C, ressuspensas em 50  $\mu$ l de água milli-Q autoclavada e a concentração de DNA determinada em relação a padrões com concentração conhecida após eletroforese em gel de agarose 1%.

#### IV.7.2. Extração de DNA total de amostras de tecido cardíaco

Brevemente, os fragmentos de tecido cardíaco destinados às análises por PCR foram retirados do etanol absoluto, triturados com auxílio de lâminas de bisturi após a evaporação do álcool e submetidos ao protocolo de lise alcalina para extração de DNA total. Para isso, as amostras trituradas foram transferidas para tubos de microcentrífuga. A seguir, foi adicionado 475  $\mu$ l H<sub>2</sub>O milli-Q autoclavada, 25  $\mu$ l NaOH 0,25 M e 5 gotas de óleo mineral em cada tubo. As amostras foram homogeneizadas vigorosamente, centrifugadas por 15 s a 14.000 rpm e

submersas em água em ebulição por 10 min. A seguir, as amostras foram centrifugadas novamente, neutralizadas com 80 µl Tris-HCl 0,1 M pH 7, diluídas 10 vezes em H<sub>2</sub>O milli-Q autoclavada e usadas diretamente nos ensaios de PCR.

#### IV.7.3. Amplificação de fragmentos de ~330 pb da região polimórfica de moléculas de minicírculos do kDNA de *Trypanosoma cruzi*

A detecção do parasito, através da amplificação do fragmento de 330 pb correspondente à região variável de moléculas de kDNA de *T. cruzi*, foi realizada como previamente descrito (ANDRADE *et al.*, 1999) com algumas modificações. As reações foram conduzidas nas seguintes condições: tampão de reação 1× pH 8,5 contendo 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (*Green GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer*, Promega, Madison, Wisconsin, USA), 250 µM de dNTPs, 1,0 µM de cada um dos iniciadores específicos (S35 e S36) (TAB. 3), 1,0 unidade de *GoTaq<sup>®</sup>* DNA Polimerase (Promega), 1,0 µl das amostras de DNA total (1,0 ng/µl) obtidas de JG ou CL Brener ou misturas artificiais das respectivas populações de *T. cruzi* (JG/CL Brener: 9/1, 3/1, 1/1, 1/3 e 1/9) ou 1,0 µl de produto de lise alcalina de tecido cardíaco diluído a 1:10; volume de água Milli-Q autoclavada suficiente para 20,0 µl e 1 gota de óleo mineral. Os ciclos de amplificação consistiram em uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida por um passo de anelamento de iniciadores a 60°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e uma nova desnaturação a 94°C por 1 min. Após 35 ciclos de amplificação, o passo de extensão a 72°C do último ciclo foi estendido para 10 min. A seguir, uma alíquota de 5,0 µl de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo utilizando-se o aparato *Scooter 100* (*Biokey American Instruments*, CA, USA) a 250 volts. Os produtos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) de baixo comprimento de onda e o gel fotografado.

#### IV.7.4. Avaliação da proporção relativa de JG e CL Brener em amostras de tecido cardíaco através da genotipagem do loco de microssatélite *TcAAAT6*

A proporção relativa das respectivas populações de *T. cruzi* em amostras de tecido cardíaco provenientes de camundongos coinfetados com JG e CL Brener foi estimada através da genotipagem do loco de microssatélite polimórfico *TcAAAT6*, conforme descrito previamente (VALADARES *et al.*, 2008) com algumas modificações. Brevemente, as reações foram realizadas nas seguintes condições: 10 mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100 (Buffer B, Promega, Madison, Wiscosin, USA), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 0,5U *Taq* DNA Polimerase (Promega), 250 µM de dNTPs, 0,3 µM de cada iniciador (*TcAAAT6*ex-direto e *TcAAAT6*ex-reverso) (TAB. 3) e 1,0 µl de produto de lise alcalina de tecido cardíaco diluído a 1:10; água Milli-Q autoclavada suficiente para 15,0 µl e 1 gota de óleo mineral. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, anelamento do iniciador a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e desnaturação a 94°C por 30 segundos. A cada cinco ciclos a temperatura de anelamento foi diminuída para 55, 53, 51 e 48°C. A essa última temperatura o número de ciclos foi aumentado para 15, sendo seguido por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Uma segunda rodada de amplificação foi realizada nas mesmas condições descritas acima com iniciadores internos (*TcAAAT6*-direto e *TcAAAT6*-reverso) (TAB. 3). Para essa segunda rodada de amplificação, 1,0 µl de amostras de DNA total a 1,0 ng/µl de JG, CL Brener ou misturas artificiais de DNA de JG e CL Brener ou 10% do volume da primeira rodada de amplificação foram usados como molde. A seguir, uma alíquota de 5,0 µl dos produtos de PCR foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% a fim de atestar a amplificação. Após isso, uma alíquota de 1,0 µl dos produtos de PCR foi aplicada em gel de poliacrilamida 6% sob condições desnaturantes e analisada em um sequenciador automático de DNA. O

tamanho dos picos específicos das respectivas populações de *T. cruzi* foi determinado e a área sob cada um desses picos usada para estimar a proporção relativa de JG e CL Brener nas amostras de tecido cardíaco, como descrito no item IV.7.8.

#### IV.7.5. Purificação do fragmento com ~330 pb

A purificação de fragmentos com ~330 pb foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (1% agarose comum e 0,5% agarose “*low melting*”), contendo brometo de etídeo 0,5 µg/ml, a 100 volts por 1 h e 30 min. A cuba utilizada na eletroforese foi submetida a tratamento prévio com ácido clorídrico (HCl) 0,25 M por 30 min e a seguir com hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M também por 30 min. Após a corrida eletroforética, fragmentos com ~330 pb foram visualizados sob luz UV de baixo comprimento de onda, removidos do gel e transferidos para tubos de microcentrífuga de 0,5 ml. A seguir, as amostras foram fundidas em banho-maria contendo água em ebulição, diluídas 1:10 em água milli-Q autoclavada e usadas diretamente nos ensaios de *LSSP-PCR*.

#### IV.7.6. Avaliação da proporção relativa de JG e CL Brener em amostras de tecido cardíaco por *LSSP-PCR*

A proporção relativa de cada população de *T. cruzi* em amostras de tecido cardíaco coletadas de animais coinfectados com JG e CL Brener também foi estimada por *LSSP-PCR*, como descrito previamente (ANDRADE *et al.*, 1999) com algumas modificações. Para isso, fragmentos de ~330 pb diluídos a 1:10 foram submetidos a um segundo ensaio de PCR em condições de baixa estringência na presença de um iniciador (S35G\*) marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) em sua extremidade 5' (TAB. 3). As reações foram

realizadas nas seguintes condições: tampão de reação 1× pH 8,5 contendo 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (*Collorless GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer*, Promega), 50 μM de dNTPs, 4,5 μM do iniciador S35G\*, 1,6 unidades de GoTaq<sup>®</sup> DNA polimerase (Promega), 1,0 μl das amostras de DNA diluídas 1:10, água Milli-Q autoclavada suficiente para 10,0 μl e 1 gota de óleo mineral. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, anelamento do iniciador a 30°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e uma nova desnaturação a 94°C por 1 min. Após 40 ciclos de amplificação, o passo de extensão a 72°C do último ciclo foi estendido para 10 minutos. A seguir, uma alíquota de 5,0 μl dos produtos de PCR foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% a fim de atestar a amplificação. Após isso, uma alíquota de 1,0 μl dos produtos de PCR foi aplicada em gel de poliacrilamida 6% sob condições desnaturantes e analisada em um sequenciador automático de DNA. O tamanho dos picos específicos das respectivas populações de *T. cruzi* foi determinado e a área sob cada um desses picos usada para estimar a proporção relativa de JG e CL Brener em amostras de tecido cardíaco, como descrito no item IV.7.8.

TABELA 3 - Sequências dos iniciadores usados nas reações de PCR.

<i>Iniciador</i>	<i>Sequência</i>
S35	5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3'
S36	5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3'
S35G*	5'- <i>Fluorescein</i> ATGTACGGGGGAGATGCATGA-3'
TcAAAT6ex-direto	5'-ACGCACTCTCTTTGTTAACAG-3'
TcAAAT6ex-reverso	5'-CCGACAACGATGACAGCAAT-3'
TcAAAT6-direto	5'- <i>Fluorescein</i> GCCGTGTCCTAAAGAGCAAG-3'
TcAAAT6-reverso	5'-GGTTTTAGGGCCTTTAGGTG-3'

#### IV.7.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Uma alíquota de 5,0 µl de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% não-desnaturante, TBE 1×, por 4 h a 100 volts. A seguir, o gel foi fixado por 10 min à temperatura ambiente em solução de etanol 10% contendo 0,5% de ácido acético e incubado por 10 min em solução de nitrato de prata 0,1%. A revelação foi feita em solução contendo 3% de NaOH (p/v) e 0,1% de formaldeído a 37% (v/v). A seguir, o processo foi interrompido com solução de fixação e o gel fotografado (SANTOS *et al.*, 1993).

#### IV.7.8. Determinação do tamanho dos fragmentos obtidos por PCR

A determinação do tamanho (pb) dos fragmentos correspondentes a picos específicos de cada população de *T. cruzi* foi realizada utilizando um sequenciador automático de DNA: *Automatic Laser Fluorescent (ALF) sequencer* (GE Healthcare, Milwaukee, Wisconsin, USA). Brevemente, uma alíquota de 1,0 µl de cada produto de PCR foi desnaturada por 3 min a 90°C e submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante (8M uréia) a 45°C por 10 h. Fragmentos fluorescentes de DNA com pesos moleculares variando de 50 em 50 pb (GE Healthcare) foram usados como padrões externos (concentração final: 5,0 fmol) nas corridas eletroforéticas. Padrões internos também foram utilizados e consistiram em fragmentos fluorescentes de tamanhos conhecidos (75, 155, 210 e 320 pb) aplicados em todas as canaletas do ALF. Fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos foram alinhados com o auxílio do programa *Allelocator version 1.03* (GE Healthcare) e o tamanho dos fragmentos de interesse determinados para cada uma das amostras. Os valores de áreas sob picos específicos de JG e CL Brener foram determinados e proporções entre somas de áreas sob picos específicos das respectivas populações de *T. cruzi* foram usadas para construir curvas padrão (FIG.8), como previamente descrito (ANDRADE *et al.*, 1999).

#### IV.8. Análise quantitativa de citocinas séricas

A concentração de citocinas séricas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, CCL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) foi determinada através do sistema *multiplex Cytometric Bead Array (CBA)* desenvolvido pela *BD Biosciences (BD Biosciences, CA, USA)* em 25  $\mu$ l de amostras de soro coletadas em 7, 14 e 21 dias após a infecção. O sistema CBA emprega uma mistura de populações de esferas com intensidades discretas de fluorescência, o que permite a detecção simultânea de múltiplos análitos em solução por citometria de fluxo. O sistema CBA usa a sensibilidade de detecção de fluorescência do citômetro de fluxo para dosar múltiplos análitos em um ensaio imunológico baseado em partículas fluorescentes. Cada esfera no sistema CBA fornece uma superfície de captura para um análito específico e é análoga a um poço coberto com anticorpo específico de captura em uma placa de *ELISA*. A mistura de partículas de captura no sistema CBA está em suspensão, o que permite a detecção simultânea de múltiplos análitos em um pequeno volume de amostra (25  $\mu$ l). As vantagens combinadas da ampla faixa de detecção de fluorescência por citometria de fluxo e a captura eficiente de múltiplos análitos por partículas em suspensão permitem o uso de diluições menores das amostras, bem como a obtenção de resultados mais rapidamente, comparado ao *ELISA* convencional. O sistema CBA é resolvido no canal de fluorescência 3 (FL-3) e foi otimizado para permitir a análise simultânea de proteínas específicas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, CCL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) em sobrenadante de cultura, plasma ou soro. Anticorpos de detecção conjugados a ficoeritrina (PE) contra proteínas específicas (*Mouse Th1/Th2 kit*: anti-IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  - *Mouse inflammation kit*: anti-IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , CCL-2 e TNF- $\alpha$ ) emitem fluorescência detectada em FL-2, o que permite a quantificação dos respectivos análitos em solução.

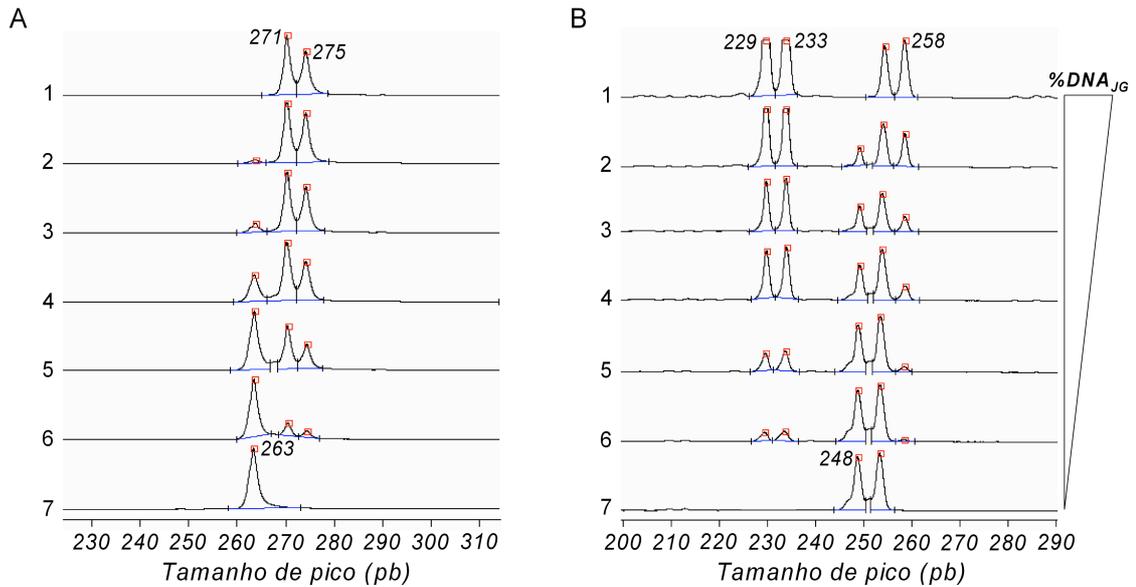


FIGURA 8 - Eletrofluorogramas obtidos a partir da análise de misturas artificiais de DNA total extraído de formas epimastigotas de *JG* e *CL Brener*. Amostras de DNA total de *JG* (Linha 1) e *CL Brener* (Linha 7) foram misturadas em diferentes proporções (*JG/CL Brener*: 9/1 (linha 2), 3/1 (linha 3), 1/1 (linha 4), 1/3 (linha 5) e 1/9 (linha 6)) e submetidas à PCR. Produtos de PCR, (A) loco *TcAAAT6* e (B) *LSSP-PCR*, foram aplicados em gel de poliacrilamida 6% sob condições desnaturantes no sequenciador ALF. Os números próximos aos picos referem-se ao tamanho dos fragmentos (pb) específicos de *JG* e *CL Brener*, que foram usados para construir a curva padrão.

#### IV.8.1. Procedimentos da técnica CBA

Primeiramente, foi feita a diluição seriada de proteínas recombinantes com a finalidade de construir curvas padrão, que foram usadas para determinar a concentração de cada proteína nas amostras de soro coletadas em 7, 14 e 21 dias após a infecção. Após a diluição seriada da solução de proteínas recombinantes, a concentração de cada proteína foi igual a: 5.000; 2.500; 1.250; 625; 312,5; 156; 80; 40 e 20 pg/ml/tubo (FIG. 9). Portanto, a curva padrão obtida para cada proteína cobre uma faixa definida de concentrações que varia de 20 a 5.000 pg/ml em ambos os *kits*. A seguir, as populações de esferas conjugadas a mAbs de captura foram homogeneizadas e misturadas em proporções equimolares. Aliquotas de 15,0 µl da mistura de esferas foram adicionadas a tubos de poliestireno. Aliquotas de 25,0 µl da solução de proteínas recombinantes submetidos à diluição seriada ou o mesmo volume de cada amostra de soro obtida em 7, 14 ou 21 dias após a infecção foram transferidos para tubos de poliestireno contendo a mistura de esferas de captura. Aliquotas de 25,0 µl do diluente utilizado na diluição das proteínas recombinantes foram usadas como controle negativo. A seguir, 18,0 µl de mAbs de detecção conjugados a PE foram acrescentados a cada tubo, as amostras foram homogeneizadas e mantidos à temperatura ambiente (TA) por 2 h, ao abrigo da luz. Após a incubação, 500 µl de tampão de lavagem (*wash buffer*) foram acrescentados em cada tubo, que foram submetidos à centrifugação a 1.800 rpm, por 10 min a 18°C. A seguir, o sobrenadante foi aspirado com o auxílio de uma bomba de vácuo e 100 µl de tampão de lavagem (*wash buffer*) foram acrescentados em cada tubo. As amostras foram homogeneizadas e a aquisição dos dados feita no citômetro de fluxo *FACScan* (BD Biosciences) (FIG. 10). Após a aquisição, os dados foram analisados com o *BD CBA Analysis Software* (BD Biosciences), conforme descrito a seguir.

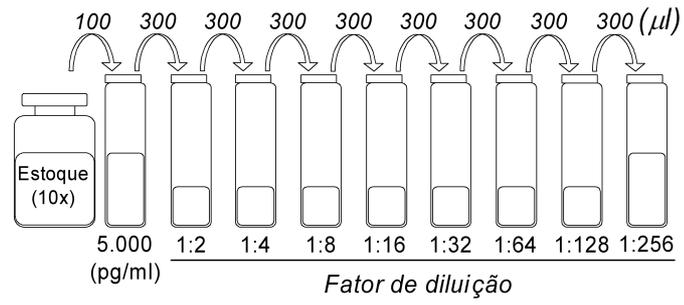


FIGURA 9 - Diluição seriada de proteínas recombinantes para a construção de curvas padrão. Padrões com concentrações conhecidas de proteínas recombinantes foram diluídos seriadamente a partir de uma concentração inicial de 5.000 pg/ml até uma concentração final de 20 pg/ml de cada proteína.

#### IV.8.2. Aquisição e análise dos dados de CBA

A aquisição dos dados foi feita no citômetro de fluxo *FACScan* (*BD Biosciences*) após a devida calibração do aparelho. As esferas emitem fluorescência a 650 nm, quando excitadas com o *laser* de argônio a 488 nm. A fluorescência emitida pelas esferas é detectada em FL-3, enquanto, os mAbs conjugados a PE emitem fluorescência a 585 nm, a qual é detectada em FL-2. Um total de 300 esferas/citocina foi adquirido com o auxílio de gráficos de tamanho (FSC: *forward scatter*) vs granulidade (SSC: *side scatter*) (FIG. 11A - C).

As populações de esferas, conjugadas a mAbs de captura, apresentam características morfométricas (tamanho e granulidade) similares (FIG. 11A), mas intensidades discretas de fluorescência (TAB. 4A e B), o que permite separá-las em FL-3 (FIG. 11C). Desse modo, a análise do deslocamento de cada população de esfera ao longo do eixo x (FL-2) é proporcional à concentração de cada proteína analisada (FIG. 12). A concentração de cada proteína (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, CCL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) nas amostras de soro coletadas em 7, 14 e 21 dias após a infecção foi determinada a partir dos valores de IMF obtidos em FL-2 com padrões com concentrações conhecidas de proteínas recombinantes. Os valores de IMF em FL-2 foram usados para construir curvas padrão com o *BD CBA Analysis Software* (FIG. 13). Após a obtenção das curvas padrão foi possível determinar a concentração de cada proteína nas amostras biológicas. A aplicação do modelo de ajuste não linear através do quarto parâmetro logístico, permitiu extrapolar valores de IMF em FL-2 de amostras de soro que não caíram dentro dos limites da curva. Para o *Mouse Th1/Th2 kit*, a sensibilidade (pg/ml) foi igual a: 5,0 (IL-2, IL-4 e IL-5); 2,5 (IFN- $\gamma$ ) e 6,3 (TNF- $\alpha$ ). Para o *Mouse inflammation kit* a sensibilidade (pg/ml) foi igual a: 5,0 (IL-6); 17,5 (IL-10); 52,7 (CCL-2); 2,5 (IFN- $\gamma$ ); 7,3 (TNF- $\alpha$ ) e 10,7 (IL-12p70).

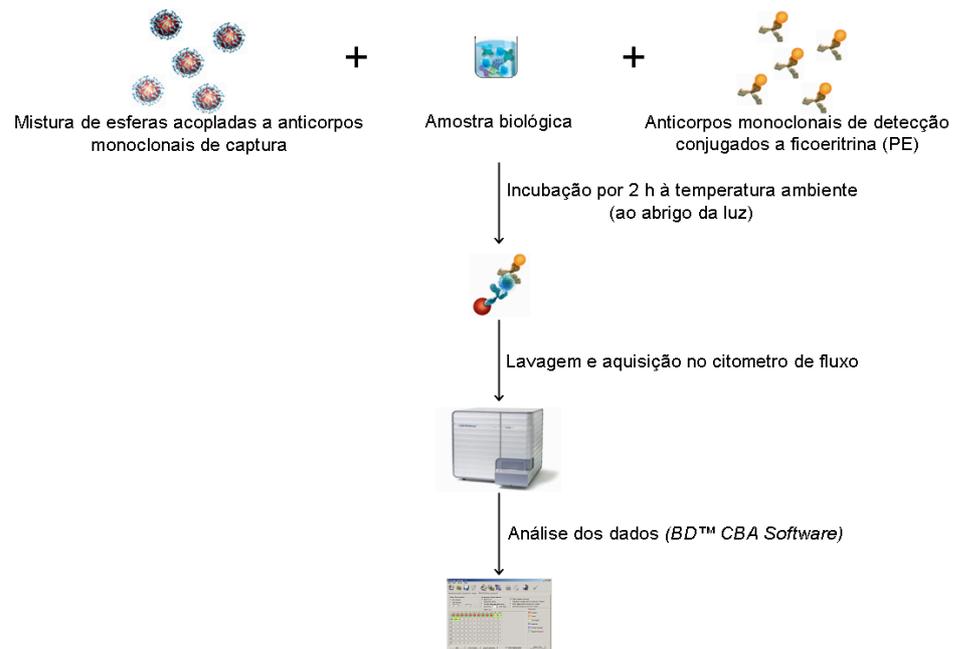


FIGURA 10 - Resumo do protocolo experimental da técnica CBA. Brevemente, as esferas de captura, a amostra biológica e os anticorpos de detecção são misturados e mantidos à TA por 2 h ao abrigo da luz. Após a incubação as esferas são lavadas, a aquisição é feita no citômetro de fluxo *FACScan* (*BD*) e as análises dos dados feita com o *BD CBA Analysis Software* (*BD*).

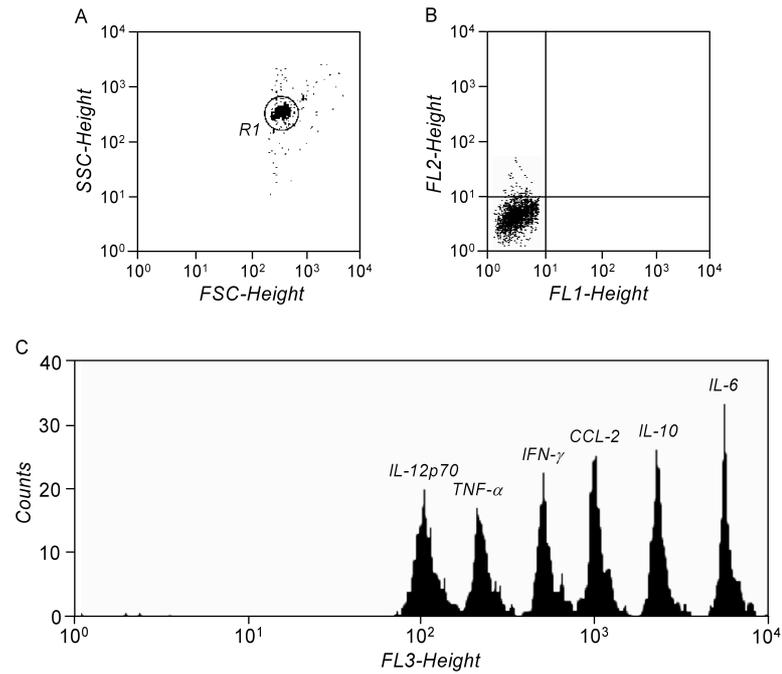


FIGURA 11 - Princípio da técnica CBA. Separação das populações de esferas com intensidades discretas de fluorescência no citômetro de fluxo *FACScan* (*BD Biosciences*, CA, USA) em FL-3. Brevemente, 1.800 partículas/região (*RI*), ou seja, em média 300 partículas/proteína foram adquiridas com base em gráficos de tamanho (*FSC*) vs granulosidade (*SSC*) (A), bem como em FL-1 vs FL-2 (B), o que demonstra que as populações de esferas são detectadas e separadas em FL-3 (C). A população de esferas que captura a *IL-12p70* apresenta a menor intensidade média de fluorescência (*IMF*), ou seja, é *dimmest*, enquanto a população que captura a *IL-6* apresenta a maior IMF (*brightest*).

TABELA 4 - Intensidade relativa de fluorescência das populações de esferas cobertas com anticorpos monoclonais de captura.

<i>Mouse Th1/Th2 kit</i>	
<i>Populações de esferas</i>	<i>Especificidade de cada população de esfera</i>
<i>A1 (Brightest)</i>	IL-2
<i>A2</i>	IL-4
<i>A3</i>	IL-5
<i>A4</i>	IFN- $\gamma$
<i>A5 (Dimmest)</i>	TNF- $\alpha$
<i>Mouse inflammation kit</i>	
<i>Populações de esferas</i>	<i>Especificidade de cada população de esfera</i>
<i>A1 (Brightest)</i>	IL-6
<i>A2</i>	IL-10
<i>A3</i>	CCL-2
<i>A4</i>	IFN- $\gamma$
<i>A5</i>	TNF- $\alpha$
<i>A6 (Dimmest)</i>	IL-12p70

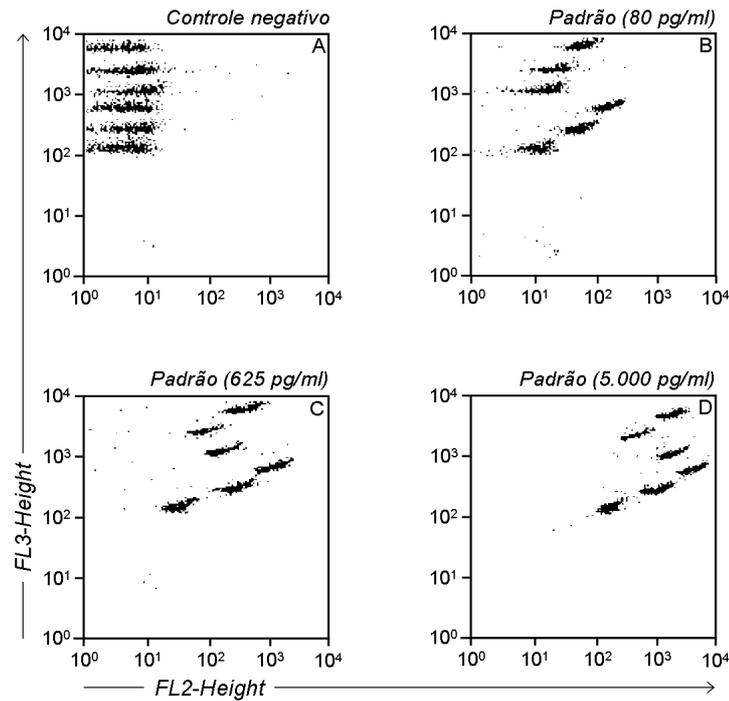


FIGURA 12 - Exemplos de dados obtidos através da análise de padrões com concentrações conhecidas de citocinas pela técnica CBA. (A) Discriminação de esferas conjugadas a mABs de captura (*kit Mouse inflammation*) com intensidades discretas de fluorescência ao longo do eixo y (FL-3) em gráficos de distribuição pontual FL-3 versus FL-2. (B - D). O deslocamento das esferas ao longo do eixo x (FL-2) é proporcional à concentração (pg/ml) de proteína. A população de esferas que captura IL-12p70 apresenta a menor IMF (*dimmet*), enquanto a população que captura IL-6 apresenta a maior IMF (*brightest*).

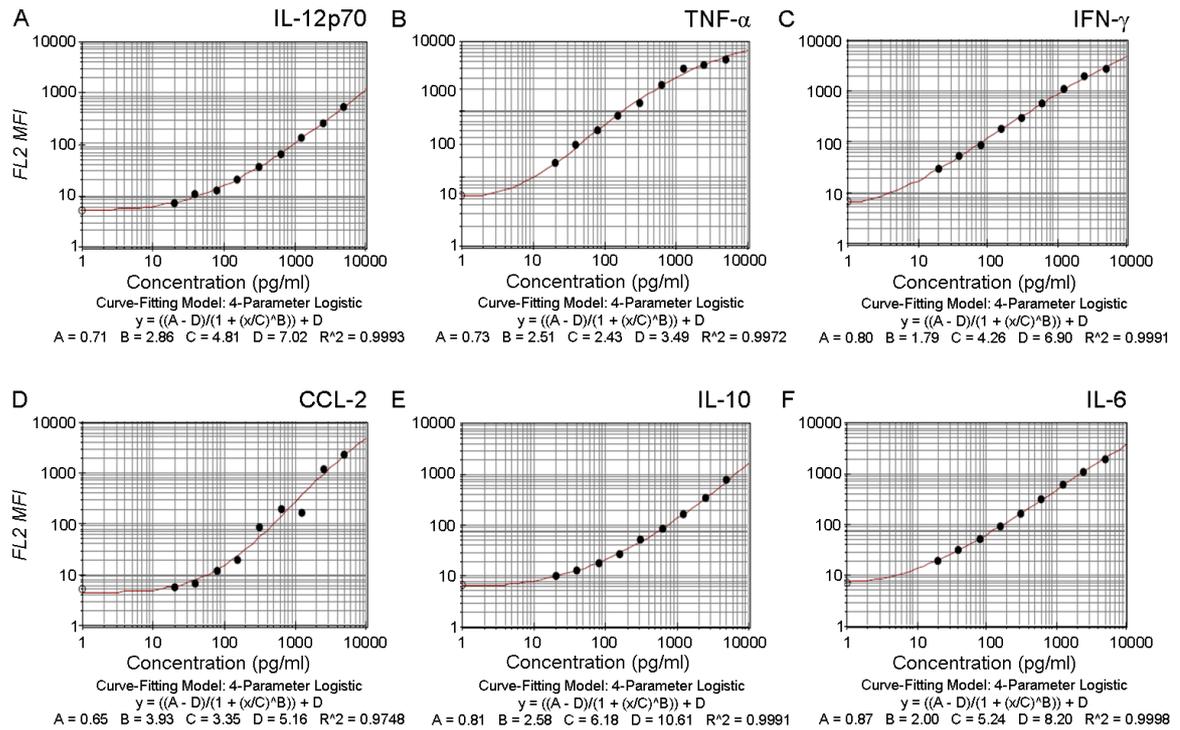


FIGURA 13 - Curvas padrão obtidas com o *kit Mouse Inflammation*. As curvas padrão foram obtidas com o *kit Mouse Inflammation* e plotadas com o *CBA Analysis Software*.

#### IV.9. Dosagem de óxido nítrico sérico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre que, entre outras coisas, desempenha um importante papel na atividade imunológica, pois é um potente agente microbicida envolvido na defesa do hospedeiro contra infecções. O NO é um produto da oxidação da arginina pela NO sintase. Como o NO é rapidamente oxidado a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) ou nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) é prática comum determinar as concentrações de  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$  como uma medida do nível de NO em amostras biológicas. O  $\text{NO}_2^-$  é o produto mais estável da oxidação de NO, por isso a quantificação de NO é normalmente feita após a redução de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  através do método de Griess. Após o processo de redução a quantificação de NO é feita através da determinação dos níveis de  $\text{NO}_2^-$ . Não foi possível fazer a redução de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ . Portanto, foi feita apenas a dosagem de  $\text{NO}_2^-$  em amostras de soro coletadas em 7, 14 e 21 dias após infecção, como descrito a seguir. Brevemente, alíquotas de 150  $\mu\text{l}$  das amostras de soro foram desproteinizadas com 15  $\mu\text{l}$  de  $\text{ZnCl}_2$  1M (Sigma, St. Louis, MO, USA), centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min e o sobrenadante usado para a dosagem de  $\text{NO}_2^-$  em placa de fundo chato com 96 poços (NUNC Brand Products, DK). A primeira coluna da placa foi utilizada para o padrão de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2^-$ ) (Sigma) e os 4 últimos poços da linha H usados para o branco. A solução padrão de  $\text{NaNO}_2^-$  foi submetida à diluição seriada a 1:2 (100  $\mu\text{M}$ ), 1:4 (50  $\mu\text{M}$ ), 1:8 (25  $\mu\text{M}$ ), 1:16 (12,5  $\mu\text{M}$ ), 1:32 (6,25  $\mu\text{M}$ ), 1:64 (3,125  $\mu\text{M}$ ), 1:128 (1,562  $\mu\text{M}$ ), 1:256 (0,781  $\mu\text{M}$ ). Tanto os padrões quanto o branco foram preparados com água milli-Q contendo 10% de  $\text{ZnCl}_2$  1M. O volume final em cada poço foi igual a 50  $\mu\text{l}$ . A seguir, alíquotas de 50  $\mu\text{l}$ /poço de cada amostra de soro foram pipetadas e 50  $\mu\text{l}$  do reagente de Griess (solução 1:1 de sulfanilamida 1% em  $\text{CH}_3\text{COOH}$  30% e N-1-naftiletilenodiamina 0,1% em  $\text{CH}_3\text{COOH}$  60%) (Sigma), preparado imediatamente antes do uso, foram pipetados em cada poço e a absorbância das amostras obtidas a 540 nm em espectrofotômetro (*Emax microplate*

*reader*, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Os valores de absorvância dos padrões de  $\text{NaNO}_2^-$  foram subtraídos do valor de absorvância do branco e usados para construir uma curva padrão através de análise ponto-a-ponto usando o programa de análise estatística *GraphPad Prism 5.00* (*GraphPad Software*). Os 108 pontos calculados com os valores de x variando de 0 a 50  $\mu\text{M}$  foram usados como uma curva padrão, que foi usada para determinar a concentração ( $\mu\text{M}$ ) de  $\text{NO}_2^-$  em cada amostra de soro.

#### IV.10. Avaliação do perfil de expressão de citocinas por células esplênicas

O perfil de expressão de citocinas por células esplênicas foi avaliado por citometria de fluxo em amostras de baço obtidas em 7, 14 e 21 dias após a infecção. O baço de cada animal foi coletado em condições estéreis em capela de fluxo laminar, transferido para um tubo contendo 5,0 ml de meio RPMI (GIBCO, Grand Island, NY, USA) e a massa (mg) de cada órgão determinada em balança de precisão. A seguir, as amostras foram mantidas a 8°C para a obtenção de suspensões de células esplênicas para as análises por citometria de fluxo, como descrito a seguir. Brevemente, as amostras de baço foram maceradas no volume original de 5,0 ml de meio RPMI, as suspensões de células esplênicas foram filtradas em tela de aço e transferidas para tubos cônicos de 15 ml (Falcon, BD Pharmingen). O volume foi completado para 10,0 ml com meio RPMI, as amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 1.300 rpm por 7 min à 18°C e o sobrenadante descartado. A seguir, as células foram ressuspensas em meio RPMI e a concentração de células determinada em câmara de Neubauer. A concentração de células foi ajustada para  $1,0 \times 10^7$  células esplênicas/ml. A seguir, 1,0 ml de suspensão celular, contendo  $1,0 \times 10^7$  células esplênicas, foi transferido para tubos de polipropileno de 14 ml (Falcon, BD Pharmingen) contendo 1,0 ml de meio RPMI suplementado com 1,6 % de L-glutamina e 5% de soro fetal bovino (SFB). A seguir, as amostras foram homogeneizadas e

incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C com 5% de umidade por 12 h. Após a incubação, foi adicionado volume suficiente de solução de brefeldina A (BFA) (Sigma, St. Louis, MO, USA), uma toxina que inibe a secreção de proteínas pelo do complexo de Golgi, para uma concentração final de 10 µg/ml. As amostras foram homogeneizadas e incubadas novamente em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C com 5% de umidade por 4 h. A seguir, foi adicionado volume suficiente de solução de EDTA (Sigma) para uma concentração final de 2,0 mM em cada tubo e as amostras mantidas à TA por 10 min. A seguir, as amostras tratadas com EDTA foram lavadas com PBS-W, PBS contendo 0,5% albumina sérica bovina (BSA) (Sigma) pH 7,4, e centrifugadas a 1.300 rpm por 7 min a 18°C, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em PBS-W e marcadas com mAbs (BD Biosciences, CA, USA) contra marcadores de superfície (CD4, CD8, CD49b, CD69 e MAC-3) e citocinas específicas (IL-10, IL-12p70, IFN-γ e TNF-α), conforme descrito a seguir (TAB. 5).

TABELA 5 - Anticorpos monoclonais usados para avaliar o perfil de expressão de citocinas por populações de células esplênicas.

<i>mAbs</i>	<i>Concentração (mg/ml)</i>	<i>População alvo</i>
anti-CD4-PerCP	0,2	Células T auxiliares
anti-CD8-FITC	0,5	Células T citotóxicas
anti-CD49b-FITC	0,5	Células NK
anti-MAC-3-FITC	0,5	Macrófagos e células dendríticas
anti-CD69-PE	0,2	Marcador de ativação celular
anti-IL10-PE	0,2	Células T e células MAC-3 <sup>+</sup>
anti-IL12p70-PE	0,2	Células MAC-3 <sup>+</sup>
anti-IFN-γ-PE	0,2	Células T e células NK
anti-TNF-α-PE	0,2	Células T, células NK e células MAC-3 <sup>+</sup>

Brevemente, alíquotas de 50, 450 ou 500 µl de suspensão de células esplênicas foram distribuídas em 5 tubos de poliestireno de 5,0 ml (Falcon) contendo mAbs contra marcadores expressos na superfície celular (TAB. 6). As amostras foram homogeneizadas e mantidas à TA por 30 min ao abrigo da luz. A seguir, a lise das hemácias foi feita através do tratamento com 2,0 ml de solução de lise *FACS Lysing/fix Solution* (BD Pharmingen) por 3 min à TA ao abrigo da luz. As amostras foram lavadas com PBS-W, centrifugadas a 1.300 rpm por 7 min a 18°C e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 500 µl de PBS-W e permeabilizadas com 3,0 ml de PBS-P, PBS contendo 0.5% saponina (Sigma), por 10 min à TA ao abrigo da luz e centrifugadas a 1.300 rpm por 7 min a 18°C. O sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuspensas em 3,0 ml de PBS-W e centrifugadas a 1.300 rpm por 7 min a 18°C. O sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuspensas em 200 µl de PBS-W, alíquotas de 50 µl foram distribuídas em placas de 96 poços com fundo em U contendo 20 µl de mAbs conjugados a PE (anti-IL-10, anti-12p70, anti-IFN- $\gamma$  e anti-TNF- $\alpha$ ), diluídos à 1:50 em PBS-P e mantidas à TA por 30 min ao abrigo da luz (TAB. 6). A seguir, as células foram lavadas com 100 µl de PBS-P e centrifugadas a 1.300 rpm por 7 min a 18°C. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 200 µl de PBS-W e centrifugadas novamente a 1.300 rpm por 7 min a 18°C. O sobrenadante foi desprezado, as células foram fixadas com 200 µl de solução fixadora (*FACS FIX Solution*: 10 g/l paraformaldeído, 10,2 g/l cacodilato de sódio, 6.63 g/l cloreto de sódio e 0.01% azida sódica) e mantidas a 4°C ao abrigo da luz. A aquisição dos dados no citômetro de fluxo FACScalibur (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) foi feita 24 h após a marcação das células com o auxílio do programa CELLQuest. Um total de 30.000 ou 50.000 eventos foram adquiridos para amostras marcadas com anticorpos anti-CD69-PE ou anti-citocina-PE, respectivamente. Diferentes estratégias de análise foram usadas no programa CELLQuest para a análise dos

dados obtidos, com a finalidade de avaliar o perfil de expressão de citocinas intracelulares por diferentes populações de células esplênicas.

#### IV.10.1. Estratégia de análise de células MAC-3<sup>+</sup>

A seleção de células esplênicas MAC-3<sup>+(high)</sup> (FIG. 14A), ou seja, células com alta expressão do marcador MAC-3 (macrófagos e células dendríticas) foi realizada em gráficos bidimensionais de FL1/anti-MAC-3-FITC *versus* granulosidade (SSC-H) e a análise da expressão de citocinas (TAB. 6) por células esplênicas MAC-3<sup>+(high)</sup> foi feita em gráficos bidimensionais de FL1 *versus* FL2 (FIG. 14B).

#### IV.10.2. Estratégia de análise de células NK, T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>

A frequência de células NK e células T esplênicas expressando o marcador de ativação CD69 e citocinas específicas (TAB. 6) foi determinada através de uma estratégia de análise convencional. A seleção da subpopulação de linfócitos foi feita em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de tamanho (FSC-H) *vs* granulosidade (SSC-H). A seguir, a determinação da frequência de cada uma das populações de células esplênicas (NK, T CD4 ou T CD8) expressando o marcador de ativação CD69 ou determinada citocina dentro da região de interesse (linfócitos) foi feita em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência FL1 ou FL3 *versus* FL2 (FIG. 15 e 16). O número absoluto de cada população de células esplênicas foi calculado a partir da frequência de cada população celular, obtido nas análises por citometria de fluxo, e do número absoluto de células esplênicas por baço, que foi determinado em câmara de Neubauer convencional.

TABELA 6 - Combinações de anticorpos monoclonais usados para avaliar o perfil de expressão de citocinas por populações de células MAC-3<sup>+</sup>, NK CD49b<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> esplênicas.

<i>Combinação de mAbs usadas para a marcação de células MAC-3<sup>+</sup> esplênicas</i>
anti-MAC-3-FITC/anti-TNF- $\alpha$ -PE
anti-MAC-3-FITC/anti-12p70-PE
anti-MAC-3-FITC/anti-IL-10-PE
<i>Combinação de mAbs usadas para a marcação de células NK CD49b<sup>+</sup> esplênicas</i>
anti-CD49b-FITC/anti-CD69-PE
anti-CD49b-FITC/anti-IFN- $\gamma$ -PE
anti-CD49b-FITC/anti-TNF- $\alpha$ -PE
<i>Combinação de mAbs usadas para a marcação de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> esplênicas</i>
anti-CD4-PerCP/anti-CD8-FITC/anti-CD69-PE
anti-CD4-PerCP/anti-CD8-FITC/anti-IL-10-PE
anti-CD4-PerCP/anti-CD8-FITC/anti-IL-12p70-PE
anti-CD4-PerCP/anti-CD8-FITC/anti-IFN- $\gamma$ -PE
anti-CD4-PerCP/anti-CD8-FITC/anti-TNF- $\alpha$ -PE

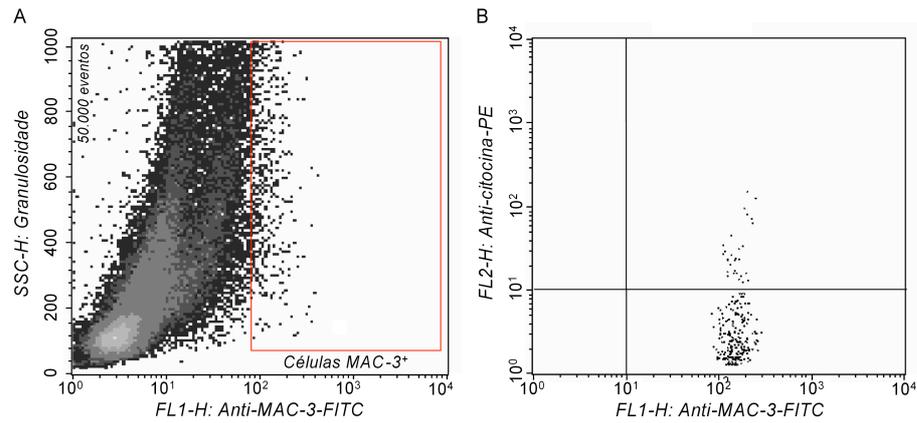


FIGURA 14 - Análise da expressão intracelular de citocinas por células esplênicas MAC-3<sup>+</sup> por citometria de fluxo. (A) Seleção da população de células esplênicas MAC-3<sup>+(high)</sup> em gráficos bidimensionais de FL1 vs granulosidade (SSC-H). (B) Frequência de células esplênicas MAC-3<sup>+(high)</sup> expressando determinada citocina (quadrante superior direito) em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência FL1 vs FL2.

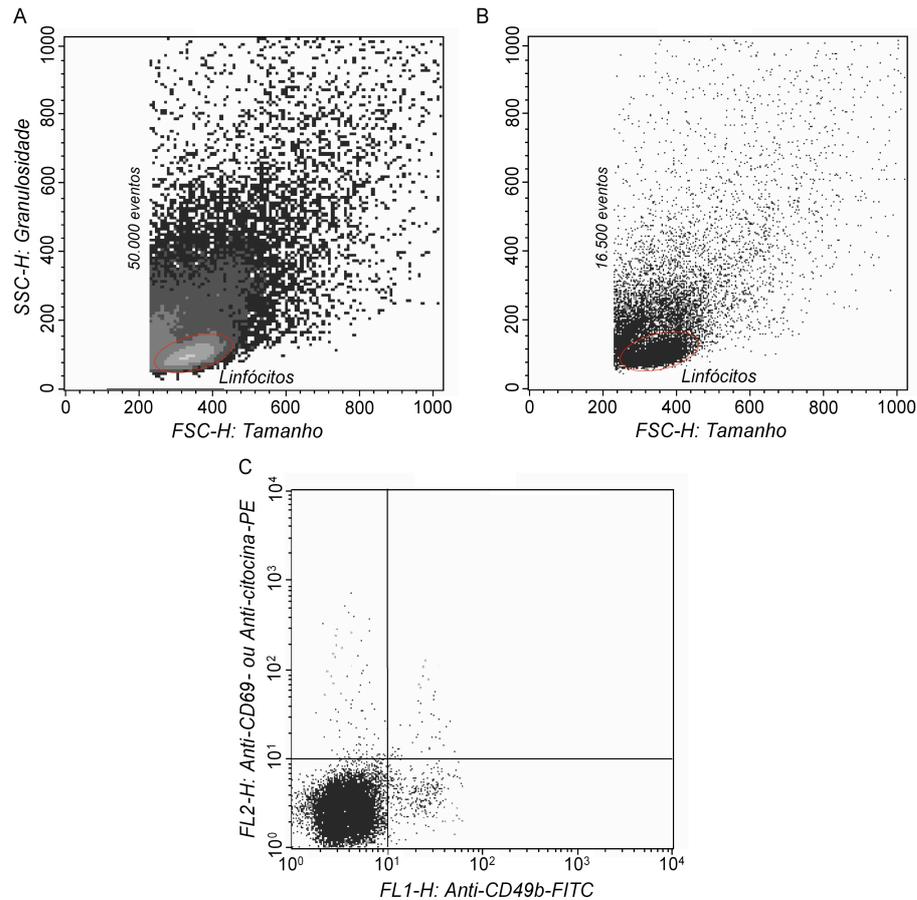


FIGURA 15 - Análise da expressão do marcador de ativação CD69 e citocinas por células NK esplênicas por citometria de fluxo. (A, B) Seleção da população de interesse (linfócitos) em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de tamanho (FSC-H) vs granulosidade (SSC-H). A determinação da frequência de células NK (C) expressando o marcador de ativação CD69 ou determinada citocina (quadrante superior direito) foi feita em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência FL1 vs FL2, respectivamente.

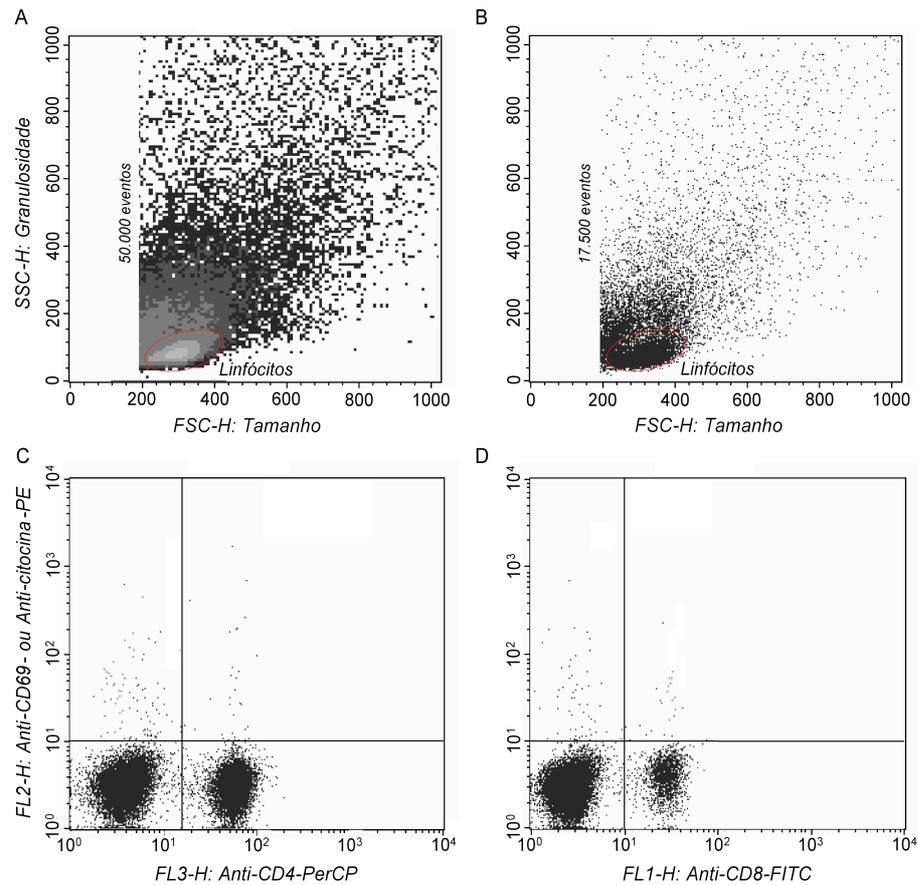


FIGURA 16 - Análise da expressão do marcador de ativação CD69 ou citocinas por células T esplênicas por citometria de fluxo. (A, B) Seleção da subpopulação de interesse (linfócitos) em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de tamanho (FSC-H) vs granulosidade (SSC-H). A determinação da frequência de células T CD4 (C) e CD8 (D) expressando o marcador de ativação CD69 ou determinada citocina (quadrante superior direito) foi feita em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência FL3 ou FL1 vs FL2, respectivamente.

#### IV.11. Análise estatística

O programa *GraphPad Prism 5.00* (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, USA) foi usado para as análises estatísticas. Os parâmetros estudados, exceto a evolução da sobrevivência, foram analisados por *One-Way Analysis of Variance (ANOVA)* e as comparações entre múltiplos grupos experimentais foram feitas com o *Student-Newman-Keuls' post test*. As comparações das curvas de sobrevivência de diferentes grupos experimentais foram realizadas usando-se o método de Kaplan-Meier e a significância das diferenças entre os grupos foi avaliada através de *logrank test*. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos. Os resultados foram expressos como a média aritmética  $\pm$  SEM.

## V. RESULTADOS

### V.1. Evolução da parasitemia, massa corporal e sobrevivência

Para avaliarmos os efeitos da associação de JG e CL Brener durante a fase aguda da infecção, camundongos BALB/c foram infectados com 100 formas tripomastigotas sanguíneas de JG ou CL Brener; ou coinfetados com 50 tripomastigotas de cada uma das respectivas populações de *T. cruzi* (50 formas tripomastigotas de JG e 50 de CL Brener). Com a finalidade de avaliar as manifestações sistêmicas da doença foi feita a avaliação da evolução da parasitemia, massa corporal e sobrevivência durante a fase aguda da infecção. Os níveis de parasitemia foram determinados a partir do 5º dia após a infecção até o momento em que formas tripomastigotas do parasito não foram mais detectadas. Durante o curso da infecção, camundongos infectados com JG apresentaram níveis de parasitemia significativamente menores em relação a animais infectados com CL Brener ou coinfetados. As principais diferenças entre os grupos experimentais foram observadas entre o 17º e 27º dia após a infecção. Por outro lado, animais infectados com CL Brener apresentaram altos níveis de parasitemia durante o curso da infecção. Camundongos coinfetados com JG e CL Brener mostraram níveis de parasitemia intermediários àqueles observados entre animais infectados com JG ou CL Brener (GRAF. 1A). Em relação à evolução da massa corporal, foram observadas perdas significativas a partir do 21º dia após a infecção entre camundongos infectados com CL Brener ou coinfetados em relação a animais normais ou infectados com JG. A massa corporal de camundongos infectados com CL Brener ou coinfetados que sobreviveram até o 30º dia após a infecção apresentou uma tendência de retorno à normalidade durante o curso da infecção (GRAF. 1B). Em acordo com relatos prévios, foi observada mortalidade nula entre camundongos infectados com JG e elevada taxa de

mortalidade (75%) entre animais infectados com CL Brener. Por outro lado, camundongos coinfectedados com JG e CL Brener apresentaram taxa de mortalidade intermediária (55%) àquelas observadas entre animais infectados com JG ou CL Brener (GRAF. 1C). A taxa de mortalidade observada entre animais coinfectedados com JG e CL Brener não pode ser atribuída unicamente a diferenças no inoculo das respectivas populações do parasito, o que foi demonstrado inoculando-se 50 formas tripomastigotas de JG ou CL Brener nas infecções simples; ou 50 formas tripomastigotas de cada população do parasito na coinfeção. Com esse protocolo foi possível demonstrar que as taxas de mortalidade observadas entre os diferentes grupos experimentais dependem da população de *T. cruzi* usada, bem como da complexidade clonal da população de *T. cruzi* infectante. De fato, camundongos infectados com 50 ou 100 formas tripomastigotas de JG ou CL Brener apresentaram manifestações clínicas, curvas de parasitemia e taxas de mortalidade muito semelhantes (*Dados não mostrados*).

## V.2. Avaliação de parâmetros hematológicos

A avaliação dos efeitos da associação de JG e CL Brener em vários parâmetros hematológicos foi feita em 7, 14 e 21 dias após a infecção em amostras de sangue coletadas do plexo axilar de camundongos BALB/c infectados com as respectivas populações do parasito. Camundongos infectados com CL Brener apresentaram uma redução significativa na contagem global de leucócitos sanguíneos em 7 e 14 dias após a infecção em relação a animais normais. Uma redução com magnitude similar àquela observada entre camundongos infectados com CL Brener foi observada entre animais infectados com JG em 7 dias após a infecção, o que também foi observado em relação a camundongos coinfectedados, mas apenas no 14º dia após a infecção. Em 21 dias após a infecção, a contagem global de leucócitos retornou próximo ao nível basal entre animais infectados com JG, o mesmo ocorreu entre animais infectados com CL Brener ou coinfectedados (GRAF. 2A). Em relação à contagem

diferencial de leucócitos foram observadas diferenças importantes entre os diferentes grupos experimentais. Reduções significativas e persistentes no número de linfócitos circulantes foram observadas entre animais infectados com JG e/ou CL Brener durante o curso da infecção. Camundongos infectados com JG apresentaram uma discreta linfopenia durante a fase aguda da infecção. Animais infectados com CL Brener apresentaram linfopenia com magnitude similar àquela observada entre camundongos infectados com JG no 7º dia após a infecção, mas em 14 e 21 dias após a infecção foi observada uma intensa linfopenia entre animais infectados com CL Brener. Por outro lado, camundongos coinfectedos apresentaram linfopenia intensa apenas no 14º dia após a infecção, com discreta recuperação em 21 dias após a infecção (GRAF. 2B). Em relação às contagens de neutrófilos segmentados e neutrófilos bastonetes, foram observados números muito próximos ao basal entre animais infectados com JG. Enquanto animais infectados com CL Brener ou coinfectedos apresentaram um quadro de neutrofilia com desvio à esquerda em 21 dias após a infecção. A magnitude da resposta neutrofilica com desvio à esquerda foi mais intensa entre camundongos infectados com CL Brener (GRAF. 2C e 2D). Em relação às contagens de eosinófilos, foram observadas reduções significativas apenas em 7 e 14 dias após a infecção entre animais infectados com JG e/ou CL Brener em relação a animais normais (GRAF. 2E). Além disso, reduções significativas nas contagens de monócitos foram observadas apenas no 14º dia após a infecção entre camundongos infectados com CL Brener ou coinfectedos em relação a animais normais (GRAF. 2F). Em relação à concentração de hemoglobina, valor hematócrito e contagem global de hemácias, reduções significativas foram observadas apenas entre camundongos infectados com CL Brener ou coinfectedos em relação a animais normais ou infectados com JG apenas em 21 dias após a infecção (TAB. 7). A contagem global de plaquetas não revelou diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais tanto em 7 quanto em 14 e 21 dias após a infecção (*Dados não mostrados*).

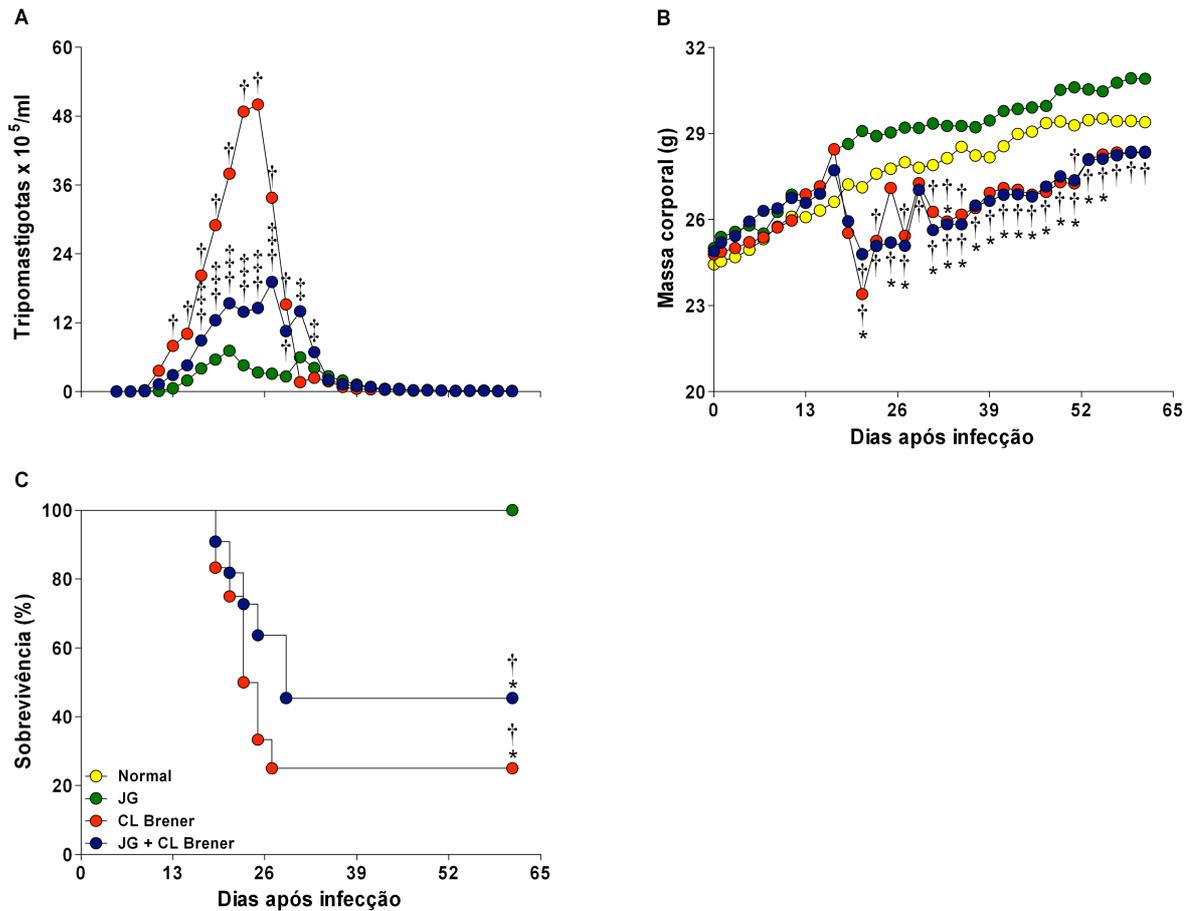


GRÁFICO 1 - Avaliação da parasitemia, massa corporal e sobrevivência em camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener durante a fase aguda da infecção. Camundongos BALB/c foram infectados com 100 formas tripomastigotas de JG ou CL Brener; ou coinfectados com 50 tripomastigotas de cada população de *T. cruzi*. A evolução da parasitemia (a) massa corporal (b) e sobrevivência (c) foi avaliada durante 61 dias após a infecção. Símbolos como a seguir: (●) animais normais; (●) animais infectados com JG; (●) animais infectados com CL Brener; (●) animais coinfectados com JG e CL Brener. A parasitemia e a massa corporal foram expressas como a média aritmética e a sobrevivência em percentagem (dados representativos de dois experimentos independentes, n = 6 ou 12). \*, † e ‡ representam  $p < 0,05$  em relação aos grupos: normal, JG e CL Brener, respectivamente.

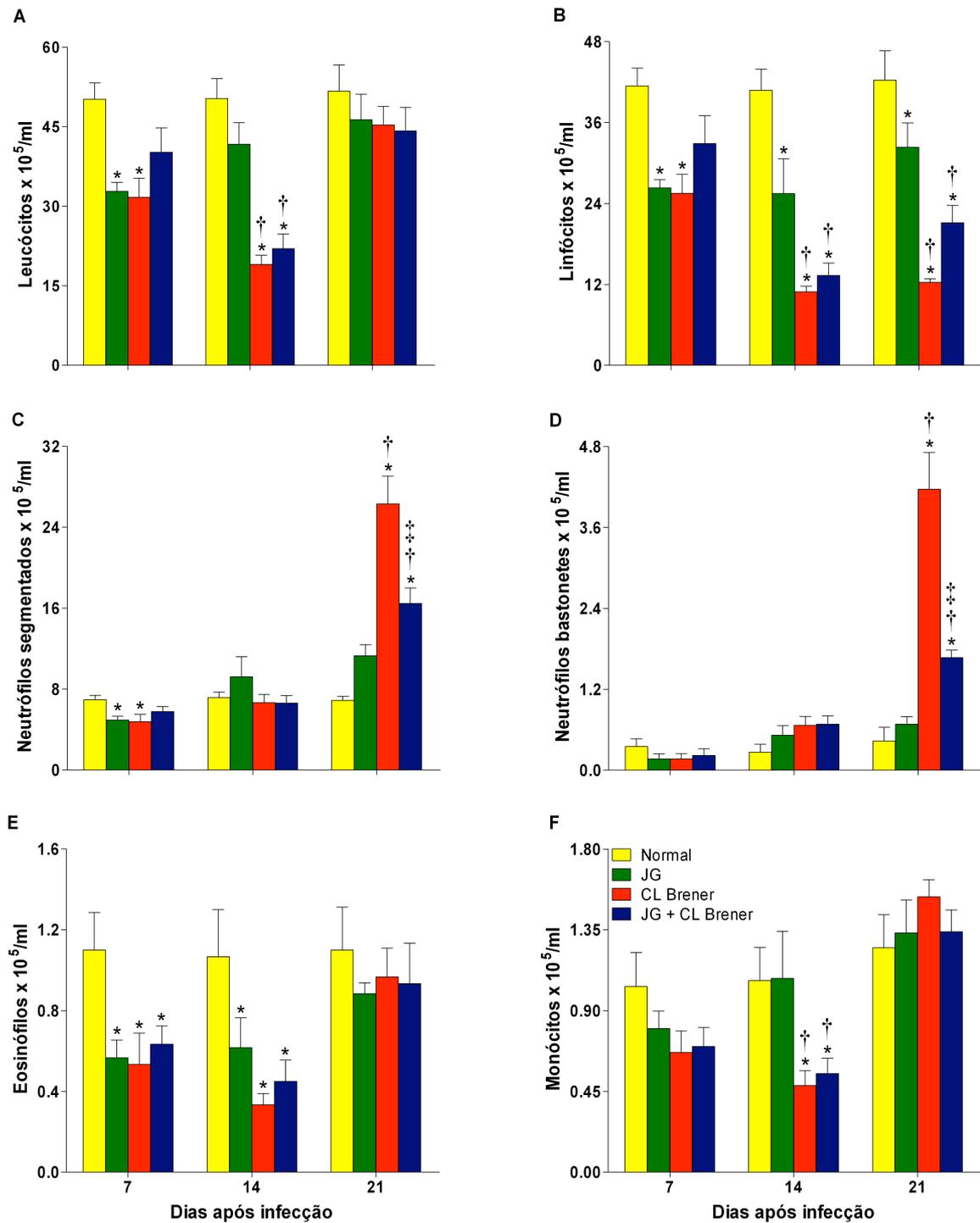


GRÁFICO 2 - Contagem global e diferencial de leucócitos de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener durante a fase aguda da infecção. As contagens global e diferencial de leucócitos foram realizadas em amostras de sangue coletadas em 7, 14 e 21 dias após a infecção. Barras como a seguir: (■) animais normais; (■) animais infectados com JG; (■) animais infectados com CL Brener; (■) animais coinfectados com JG e CL Brener. Os valores são expressos como a média aritmética ± SEM (dados representativos de dois experimentos independentes, n = 3). \*, † e ‡ representam  $p < 0,05$  em relação aos grupos: normal, JG e CL Brener, respectivamente.

TABELA 7 - Concentração de hemoglobina, valor hematócrito e concentração de hemácias em 21 dias após a infecção.

<i>Grupos experimentais</i>	<i>Hemoglobina (g/dl)</i>	<i>Hematócrito (%)</i>	<i>Hemácias (<math>\times 10^9/ml</math>)</i>
<i>Normal</i>	15.08 $\pm$ 0.64	42.97 $\pm$ 2.14	8.95 $\pm$ 0.33
<i>JG</i>	14.42 $\pm$ 0.61	41.27 $\pm$ 2.20	8.78 $\pm$ 0.41
<i>CL Brener</i>	10.85 $\pm$ 0.31 <sup>*†</sup>	32.07 $\pm$ 1.07 <sup>*†</sup>	7.00 $\pm$ 0.12 <sup>*†</sup>
<i>JG + CL Brener</i>	11.88 $\pm$ 0.26 <sup>*†</sup>	34.85 $\pm$ 0.99 <sup>*†</sup>	7.48 $\pm$ 0.20 <sup>*†</sup>

Os grupos experimentais designados como *Normal*: camundongos BALB/c não infectados; *JG*: animais infectados com JG; *CL Brener*: animais infectados com CL Brener e *JG + CL Brener*: animais coinfectados com JG e CL Brener. As infecções foram feitas como descrito anteriormente na FIG. 1. O eritrograma foi realizado em amostras de sangue coletadas em 7, 14 e 21 dias após a infecção, mas apenas os resultados obtidos no 21º dia após a infecção são mostrados. Os valores são expressos como a média aritmética  $\pm$  SEM (dados representativos de dois experimentos independentes, n = 3). \* e † representam  $p < 0,05$  em relação aos grupos normal e JG, respectivamente.

### V.3. Análise histopatológica e morfométrica (tecido cardíaco)

A fim de avaliar possíveis danos cardíacos, desencadeados pela resposta inflamatória induzida pela infecção por *T. cruzi*, foi feita a análise do infiltrado inflamatório cardíaco na fase aguda da infecção. Além disso, foi feita uma estimativa do parasitismo cardíaco através da contagem de ninhos de amastigotas em 7, 14 e 21 dias após a infecção.

No 7º dia após a infecção, foi observada uma miocardite aguda mais intensa entre camundongos infectados com JG em relação àqueles infectados com CL Brener ou coinfectados, os quais apresentaram discreta miocardite aguda com raros focos inflamatórios. O infiltrado inflamatório cardíaco constituído principalmente por células mononucleares próximas a vasos sanguíneos com parede discretamente espessada foi observado entre animais infectados com JG e/ou CL Brener. Além disso, também foram observados edema e congestão vascular discreta em vasos do miocárdio. Entretanto, em 7 dias após a infecção não foram observados ninhos de amastigotas ou alterações patológicas em células musculares estriadas cardíacas (FIG. 17A - D). Um cenário muito diferente foi observado no 14º dia após a infecção, pois todas as amostras de tecido cardíaco provenientes de animais infectados com JG e/ou CL Brener apresentaram um infiltrado inflamatório mais intenso com focos inflamatórios esparsos e qualitativamente semelhantes. Ninhos de amastigotas ainda não foram visualizados (FIG. 18A - D).

No 21º dia após a infecção, o infiltrado inflamatório cardíaco entre animais infectados com JG e/ou CL Brener apresentou focos inflamatórios alargados em forma de grandes traves, muitas vezes entremeados por tecido de granulação, caracterizado pela presença de tecido conjuntivo delicado e vasos neoformados. Além disso, o infiltrado inflamatório apresentou-se intensamente reacional com predomínio de células mononucleares com núcleos grandes e nucléolos evidentes. A infecção por JG desencadeou uma miocardite menos intensa,

predominantemente focal e mais restrita à face epicárdica do miocárdio, com pequenos focos inflamatórios próximos a vasos sanguíneos e sem fenômenos alterativos. Animais infectados com CL Brener apresentaram intensa miocardite difusa, caracterizada por extensas alterações degenerativas de cardiomiócitos, tais como: eosinofilia, vacuolização e sinais de necrose. Por outro lado, foi observada miocardite aguda difusa e com intensidade intermediária entre animais coinfectedados em relação àqueles infectados com JG ou CL Brener (FIG. 19A - D). A análise quantitativa do infiltrado inflamatório cardíaco revelou um aumento significativo da celularidade do miocárdio entre camundongos infectados com JG e/ou CL Brener durante a fase aguda da infecção. Entretanto, diferenças importantes entre os grupos experimentais foram observadas apenas no 21º dia após a infecção: camundongos infectados com JG ou coinfectedados apresentaram celularidade semelhante no miocárdio, mas significativamente menor em relação a animais infectados com CL Brener (FIG. 19E).

Em relação à avaliação do parasitismo cardíaco, foi observado um aumento significativo no número de ninhos de amastigotas entre animais infectados com CL Brener em relação a camundongos infectados com JG. Animais coinfectedados apresentaram uma quantidade intermediária de ninhos de amastigotas em relação a camundongos infectados com JG ou CL Brener (FIG. 19F). Os ninhos de amastigotas observados em amostras de tecido cardíaco coletadas de camundongos infectados com CL Brener eram pequenos e localizados principalmente próximos ou dentro de grandes focos inflamatórios (Detalhe na FIG. 19C). Em contraste, ninhos de amastigotas observados no tecido cardíaco de animais infectados com JG ou coinfectedados eram grandes, íntegros em sua maioria e visualizados principalmente distantes de focos inflamatórios (Detalhe na FIG. 19D).

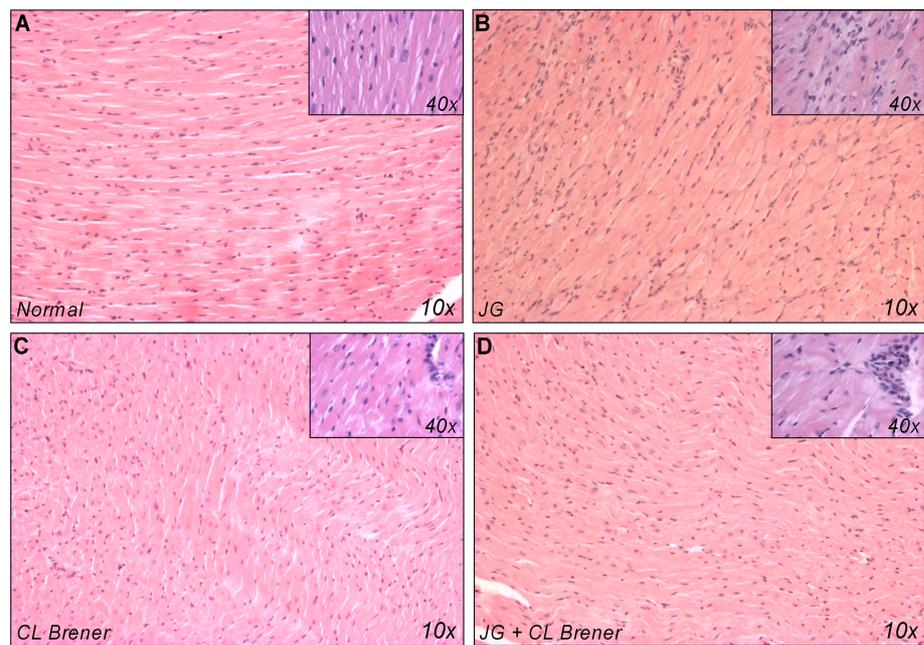


FIGURA 17 - Análise histopatológica de amostras de tecido cardíaco obtidas de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener em 7 dias após a infecção. As infecções foram feitas como descrito no GRAF. 1 e os animais sacrificados em 7 dias após a infecção. Secções semi-consecutivas de miocárdio (H&E) foram submetidas à análise histopatológica em 10x (fotos panorâmicas) e 40x (detalhes). Os grupos experimentais foram designados como *Normal*: camundongos BALB/c não infectados (A); *JG*: animais infectados com JG (B); *CL Brener*: animais infectados com CL Brener (C) e *JG + CL Brener*: animais coinfetados com JG e CL Brener (D). Figuras representativas de dois experimentos independentes, n = 3.

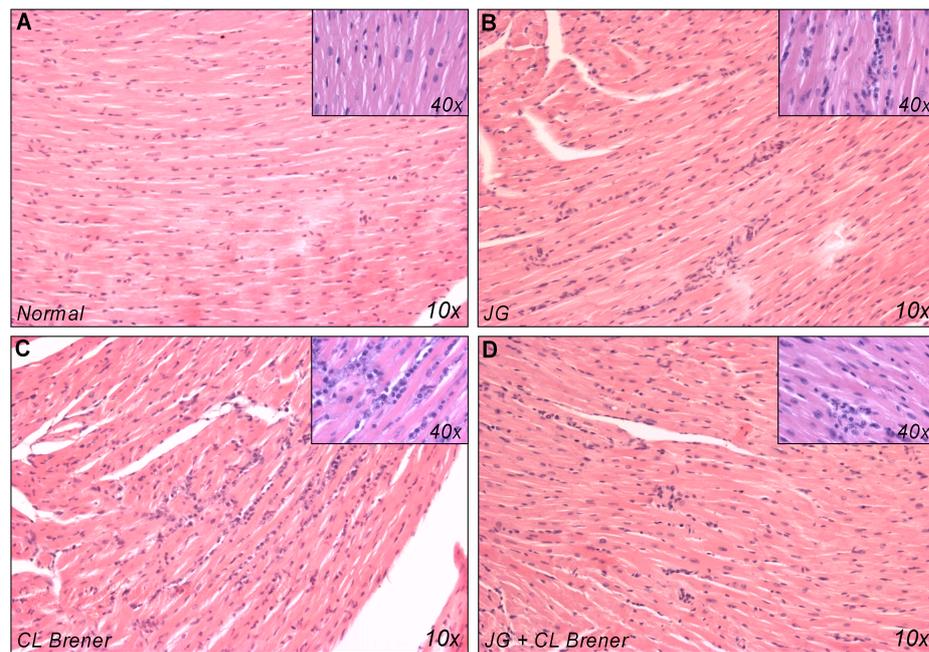


FIGURA 18 - Análise histopatológica de amostras de tecido cardíaco obtidas de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener em 14 dias após a infecção. As infecções foram feitas como descrito no GRAF. 1 e os animais sacrificados em 14 dias após a infecção. Secções semi-consecutivas de miocárdio (H&E) foram submetidas à análise histopatológica em 10x (fotos panorâmicas) e 40x (detalhes). Os grupos experimentais foram designados como na FIG. 17. Figuras representativas de dois experimentos independentes,  $n = 3$ .

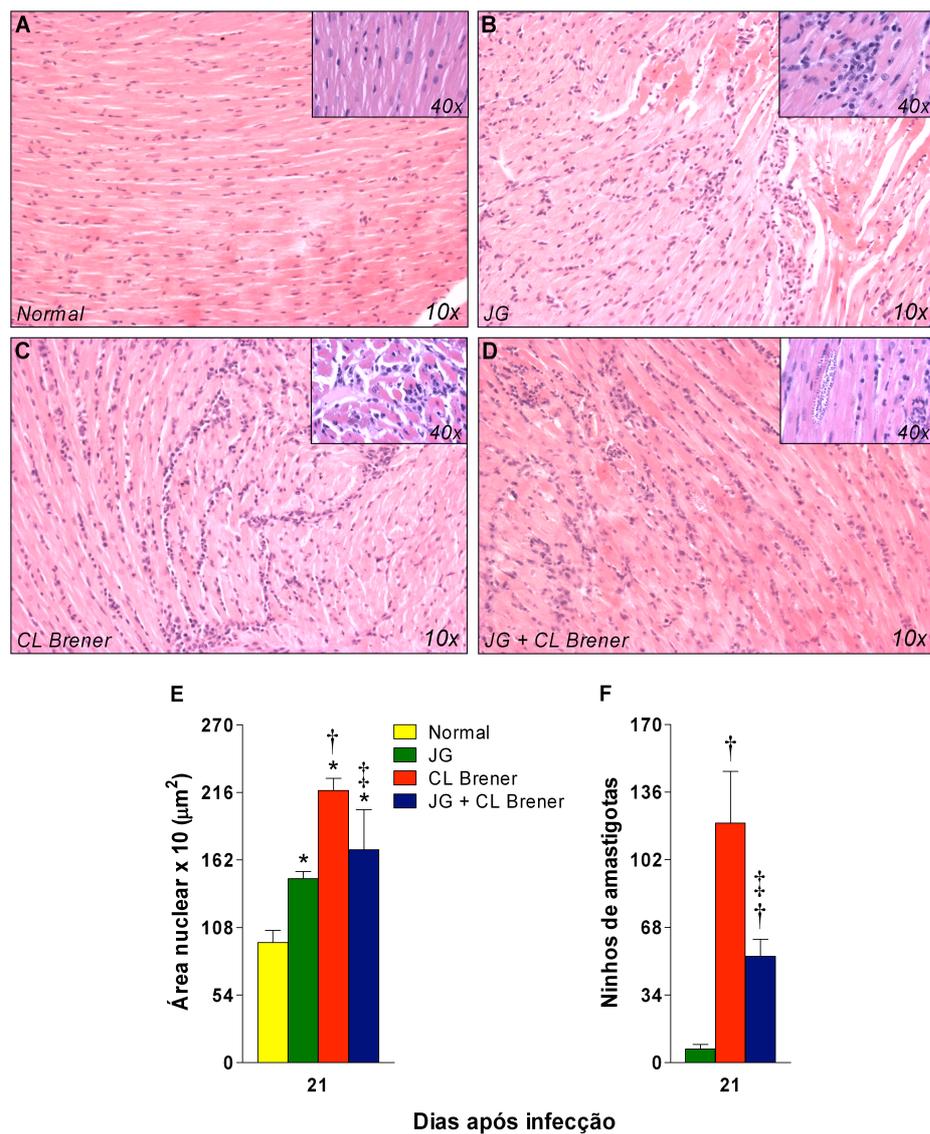


FIGURA 19 - Análise histopatológica (qualitativa e quantitativa) e avaliação do parasitismo em amostras de tecido cardíaco obtidas de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener em 21 dias após a infecção. As infecções foram feitas como descrito no GRAF. 1 e os animais sacrificados em 21 dias após a infecção. Secções semi-consecutivas de miocárdio (H&E) foram submetidas à análise histopatológica (qualitativa e quantitativa) em 10x (fotos panorâmicas) e 40x (detalhes). Os grupos experimentais foram designados como descrito na FIG. 17. Para a análise morfométrica, a área nuclear (corada em azul) de células presentes em cada campo analisado foi digitalizada e automaticamente medida em  $\mu\text{m}^2$  (E). O parasitismo cardíaco foi estimado através da contagem de ninhos de amastigotas (40x) em três secções semi-consecutivas de tecido cardíaco (H&E) obtidas em 21 dias após a infecção (F). Barras como descrito no GRAF. 2. Os valores são expressos como a média aritmética  $\pm$  SEM (dados representativos de dois experimentos independentes,  $n = 3$ ). \*, † e ‡ representam  $p < 0,05$  em relação aos grupos: normal, JG e CL Brener, respectivamente.

#### V.4. Detecção do parasito e avaliação da proporção relativa de JG e CL Brener em amostras de tecido cardíaco

A detecção do parasito em amostras de tecido cardíaco, provenientes de animais infectados com JG e/ou CL Brener, foi feita através da amplificação do fragmento de 330 pb da região variável de moléculas de minicírculos do kDNA de *T. cruzi*, que permitiu detectar o parasito em todas as amostras de tecido cardíaco coletadas tanto no 14º quanto no 21º dia após a infecção. Por outro lado, só foi possível detectar o parasito apenas em algumas amostras coletadas no 7º dia após a infecção, o que pode ser explicado pelo baixo parasitismo tecidual na fase inicial da infecção (FIG. 20). Após a detecção do parasito em amostras de tecido cardíaco, foi realizada a sua genotipagem apenas em amostras provenientes de animais coinfectados com JG e CL Brener, através da análise de um loco (*TcAAAT6*) de microssatélite polimórfico, bem como através da avaliação de perfis de LSSP-PCR.

A genotipagem do loco de microssatélite polimórfico *TcAAAT6* em amostras de tecido cardíaco provenientes de animais coinfectados, que apresentaram PCR positiva na amplificação do fragmento de 330 pb, revelaram a presença de alelos (271 e 275 pb) característicos de JG em 16% das amostras obtidas no 14º dia após a infecção e em 50% das amostras coletadas em 21 dias após a infecção. Por outro lado, o alelo (263 pb) característico de CL Brener foi detectado em 100% das amostras coletadas 14 e 21 dias após a infecção (FIG. 21). Os valores referentes a áreas sob picos específicos das respectivas populações do parasito foram usados para estimar a proporção relativa de cada uma das populações de *T. cruzi* (JG e CL Brener) em amostras de tecido cardíaco provenientes de animais coinfectados. Essa estratégia permitiu observar um claro predomínio de CL Brener em relação a JG de  $97 \pm 3$  e  $93 \pm 3\%$  em amostras de tecido cardíaco provenientes de animais coinfectados coletadas em 14 e 21 dias após a infecção, respectivamente (FIG. 21).

Resultados similares foram observados com a técnica de LSSP-PCR. A avaliação de perfis de LSSP-PCR, obtidos a partir da análise de amostras de tecido cardíaco coletadas de animais coinfetados, revelou a presença de fragmentos com tamanhos (229, 233 e 258 pb) característicos de JG em 66% das amostras obtidas no 14º dia após a infecção e em 100% das amostras coletadas em 21 dias após a infecção. Por outro lado, o fragmento de 248 pb, característico de CL Brener, foi detectado em 100% das amostras coletadas tanto em 14 quanto em 21 dias após a infecção (FIG. 22). A quantidade relativa de moléculas de minicírculos do kDNA provenientes de CL Brener nas respectivas amostras de tecido cardíaco foi estimada em  $76 \pm 9$  e  $77 \pm 8\%$  em amostras coletadas em 14 e 21 dias após a infecção, respectivamente. Portanto, mesmo utilizando duas técnicas com alvos moleculares distintos foi possível observar um claro predomínio de CL Brener em relação à JG nas amostras de tecido cardíaco obtidas durante a fase aguda da infecção (FIG. 22).

#### V.5. Análise quantitativa de citocinas séricas

Os níveis séricos de IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, CCL2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram determinados com a finalidade de avaliar se as diferenças entre os grupos experimentais observadas durante a fase aguda da infecção poderiam ser relacionadas a perfis específicos de produção de citocinas. Com essa técnica, foi possível observar apenas uma discreta elevação nos níveis séricos de IL-2 (*Normal*:  $1.70 \pm 0.13$ ; *CL Brener*:  $2.18^* \pm 0.11$  pg/ml, média aritmética  $\pm$  SEM,  $*p < 0,05$ ) e IL-5 (*Normais*:  $2.70 \pm 0.45$ ; *CL Brener*:  $5.08^* \pm 0.38$  pg/ml, média aritmética  $\pm$  SEM,  $*p < 0,05$ ) entre animais infectados com CL Brener em relação a animais normais apenas no 14º dia após a infecção. Se essa pequena variação na concentração dessas citocinas em relação aos níveis basais apresenta efeitos biológicos significativos é uma incógnita.

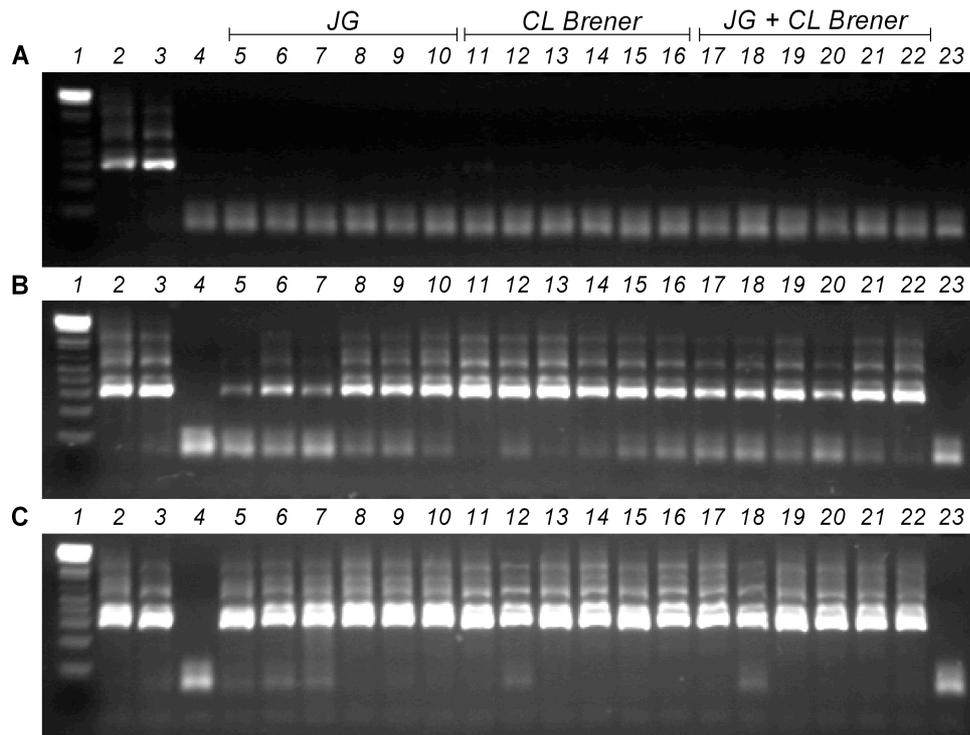


FIGURA 20 - Detecção do parasito em amostras de tecido cardíaco obtidas de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener em 7, 14 e 21 dias após a infecção. O parasito foi detectado através da amplificação do fragmento de 330 pb de moléculas de minicírculos do kDNA de *T. cruzi* em amostras de tecido cardíaco obtidas em 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após a infecção. Na canaleta 1 das figuras A, B e C é visualizado o perfil do padrão de tamanho molecular (1Kb DNA ladder da Pharmacia). Nas canaletas 2 e 3 foram aplicados produtos de PCR de amostras de DNA total de JG e CL Brener, respectivamente. Na canaleta 4 foi aplicado produto de PCR de uma amostra de DNA total de camundongo BALB/c não infectado com *T. cruzi*. Nas canaletas 5 a 10, 11 a 16 e 17 a 22 foram aplicados produtos de PCR de amostras de DNA total obtidas por lise alcalina de fragmentos de tecido cardíaco provenientes de camundongos BALB/c infectados com JG, CL Brener ou coinfetados, respectivamente. A canaleta 23 corresponde ao branco da reação.

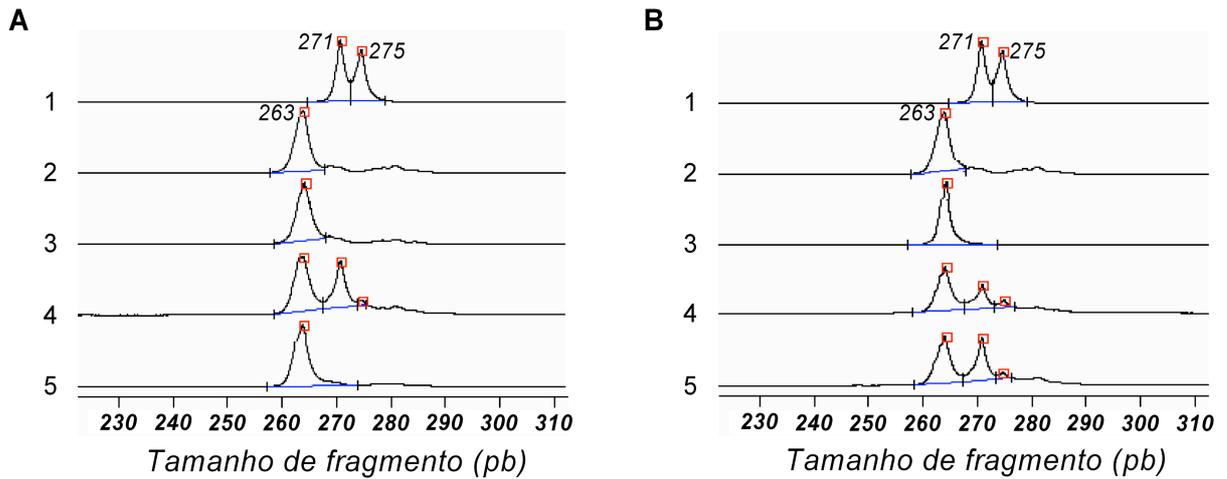


FIGURA 21 - Eletrofluorogramas obtidos a partir da análise de fragmentos amplificados por PCR do loco de microssatélite *TcAAAT6* em amostras de tecido cardíaco obtidas de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener. As linhas 1 e 2 em ambas as figuras mostram perfis obtidos a partir da análise de amostras de coração provenientes de animais infectados com JG ou CL Brener, respectivamente. As linhas 3 a 5 em ambas as figuras mostram perfis obtidos a partir da análise de amostras de coração coletadas de animais coinfectados em 14 (A) e 21 (B) dias após a infecção, respectivamente. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes,  $n = 3$ . Os números entre parênteses correspondem ao tamanho dos alelos em pares de bases (pb).

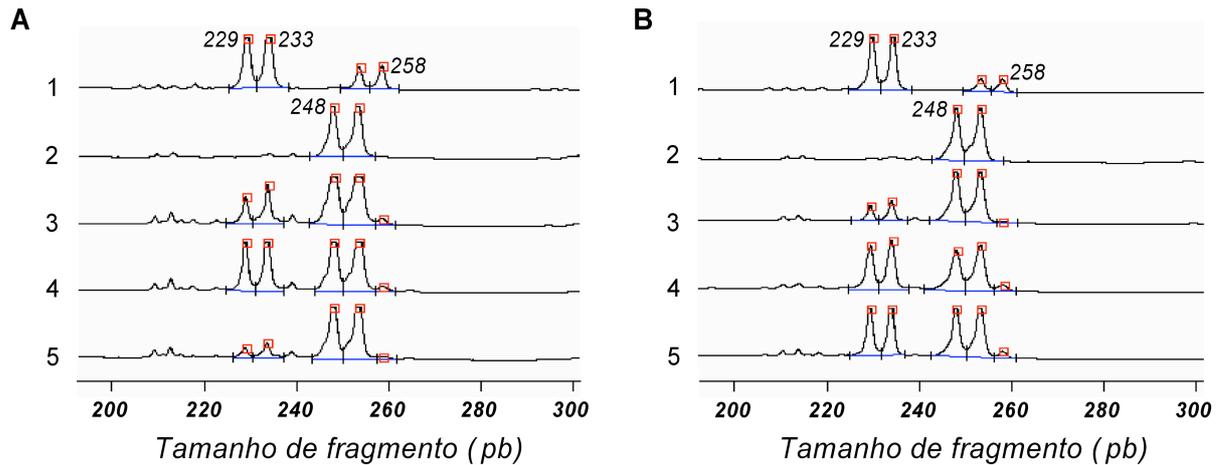


FIGURA 22 - Eletrofluorogramas obtidos a partir da análise de fragmentos amplificados por LSSP-PCR em amostras de tecido cardíaco obtidas de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener. As linhas 1 e 2 em ambas as figuras mostram perfis obtidos a partir da análise de amostras de coração provenientes de animais infectados com JG ou CL Brener, respectivamente. As linhas 3 a 5 em ambas as figuras mostram perfis obtidos a partir da análise de amostras de coração coletadas de animais coinfectados em 14 (A) e 21 (B) dias após a infecção, respectivamente. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes,  $n = 3$ . Os números entre parênteses correspondem ao tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb).

Além disso, embora tenha sido possível detectar *IL-4* e *IL-12p70* em todas as amostras analisadas, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos experimentais durante o curso da infecção (*Dados não mostrados*). Um panorama muito diferente foi observado para as demais citocinas (*TNF- $\alpha$* , *CCL2*, *IL-6*, *IFN- $\gamma$*  e *IL-10*) avaliadas. Um aumento significativo e com padrão cinético muito similar foi observado nos níveis de *TNF- $\alpha$*  e *CCL2* entre animais infectados com CL Brener ou coinfectados em relação a animais normais ou infectados com JG durante a fase aguda da infecção (GRAF. 3A e B). Em relação aos níveis de *IL-6*, também foi observada uma elevação significativamente maior entre animais infectados com CL Brener ou coinfectados em relação a animais normais ou infectados com JG, mas apenas no 14º dia após a infecção. Em 21 dias após a infecção os níveis séricos de *IL-6* aumentaram significativamente entre animais infectados com JG em relação a animais normais e alcançaram uma magnitude semelhante àquela observada entre animais infectados com CL Brener ou coinfectados. Interessantemente, no 21º dia após a infecção, animais infectados com CL Brener ou coinfectados apresentaram uma redução significativa nos níveis de *IL-6* em relação àqueles detectados no 14º, mas apesar dessa redução os níveis séricos dessa citocina ainda continuaram elevados em relação ao nível basal (GRAF. 3C). Resultados semelhantes foram observados em relação aos níveis séricos de *IFN- $\gamma$*  entre animais infectados com CL Brener ou coinfectados tanto em 14 quanto em 21 dias após a infecção. Entretanto, os níveis séricos de *IFN- $\gamma$*  observados entre animais infectados com JG foram significativamente maiores em relação a animais normais apenas no 14º dia após a infecção e com magnitude significativamente menor em relação a animais infectados com CL Brener ou coinfectados (GRAF. 3D). Em relação aos níveis séricos de *IL-10*, uma elevação significativa foi observada apenas entre animais coinfectados em relação aos demais grupos experimentais apenas no 14º dia após a infecção (GRAF. 3E).

É importante ressaltar que enquanto os níveis séricos de IL-10 se mantiveram próximos ao basal, os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , CCL2, IL-6 e IFN- $\gamma$ ) apresentaram grandes variações durante o curso da infecção. Portanto, com a finalidade de evidenciar possíveis desequilíbrios na rede de citocinas, foi calculada a relação entre os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e os níveis séricos de IL-10 durante a fase aguda da infecção. A relação TNF- $\alpha$ /IL-10 foi significativamente maior entre camundongos infectados com CL Brener em relação aos demais grupos experimentais no 14º dia após a infecção. No 21º dia após a infecção, houve um aumento significativo e com a mesma magnitude na relação TNF- $\alpha$ /IL-10 entre animais infectados com CL Brener ou coinfectados (GRAF. 4A). Por outro lado, a estabilização dos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e IL-10 próximos ao basal entre animais infectados com JG em 7, 14 e 21 dias após a infecção resultou na manutenção de uma baixa relação TNF- $\alpha$ /IL-10 durante todo o curso da infecção. Além disso, animais infectados com CL Brener ou coinfectados apresentaram relações CCL2/IL-10 e IFN- $\gamma$ /IL-10 significativamente maiores em relação a animais normais ou infectados com JG em 21 dias após a infecção (GRAF. 4B e C). É importante ressaltar que a relação TNF- $\alpha$ /IL-10 foi significativamente menor entre animais coinfectados com JG e CL Brener em relação àqueles infectados com CL Brener apenas no 14º dia após a infecção, o que também ocorreu para a relação CCL2/IL-10, mas apenas no 21º dia após a infecção (GRAF. 4A e B). Não foi observada nenhuma diferença significativa na relação IL-6/IL-10 entre os grupos experimentais durante o curso da infecção (GRAF. 4D). Em conjunto, esses resultados demonstram claramente que a infecção de camundongos BALB/c por JG e/ou CL Brener desencadeia perturbações na rede de citocinas, que podem ser correlacionadas com as manifestações clínicas observadas durante o curso da infecção. Em relação à produção de NO, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos experimentais durante o curso da infecção (*Dados não mostrados*).

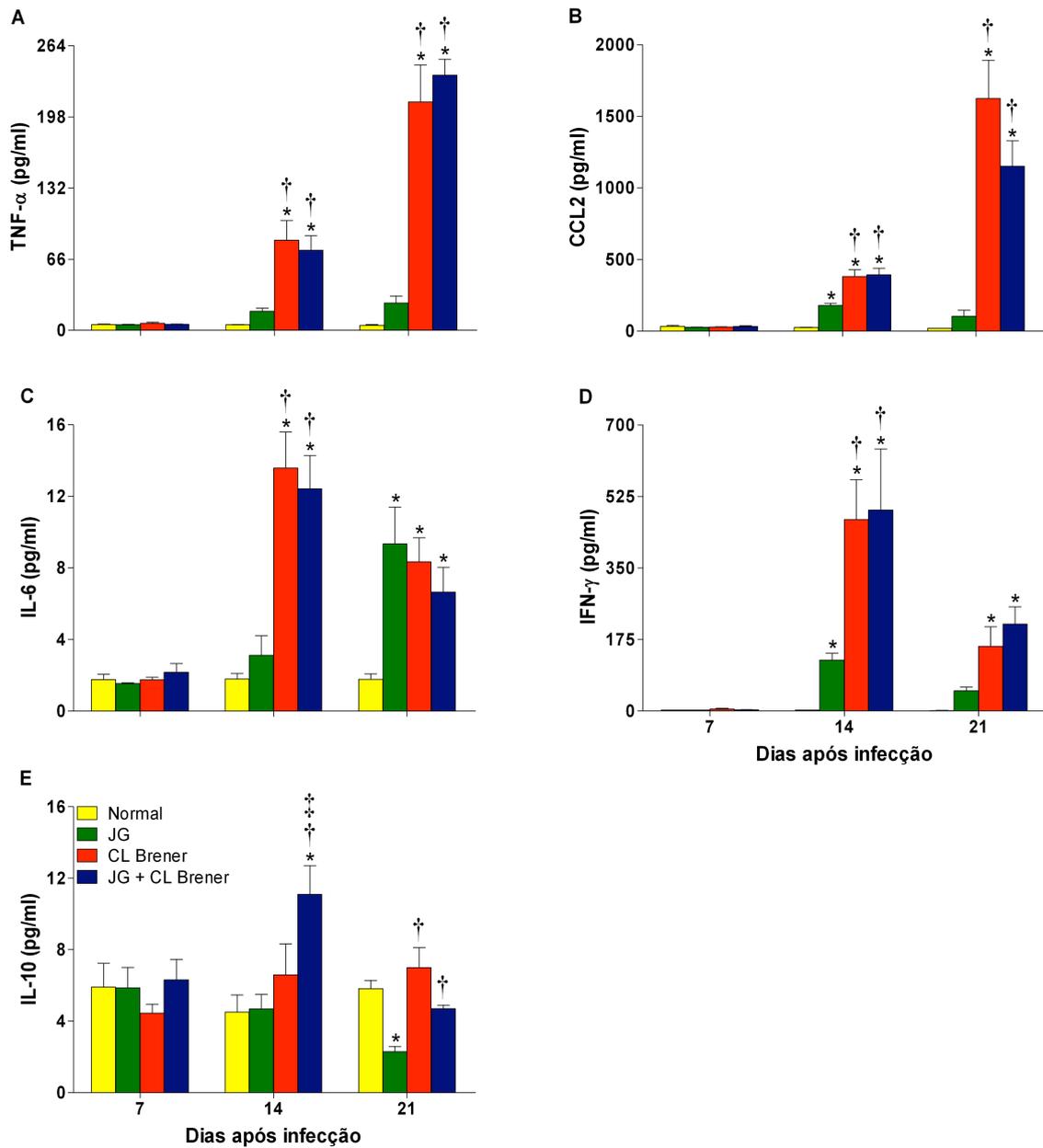


GRÁFICO 3 - Avaliação dos níveis de citocinas em amostras de soro de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener em 7, 14 e 21 dias após a infecção. As infecções foram feitas como descrito no GRAF. 1 e os níveis séricos de citocinas foram determinados em amostras de soro coletadas em 7, 14 e 21 dias após a infecção através do sistema *multiplex (CBA)* da BD. Barras como descrito no GRAF. 2. Os valores são expressos como a média aritmética  $\pm$  SEM (dados representativos de dois experimentos independentes,  $n = 3$ ). \*, † e ‡ representam  $p < 0,05$  em relação aos grupos: normal, JG e CL Brener, respectivamente.

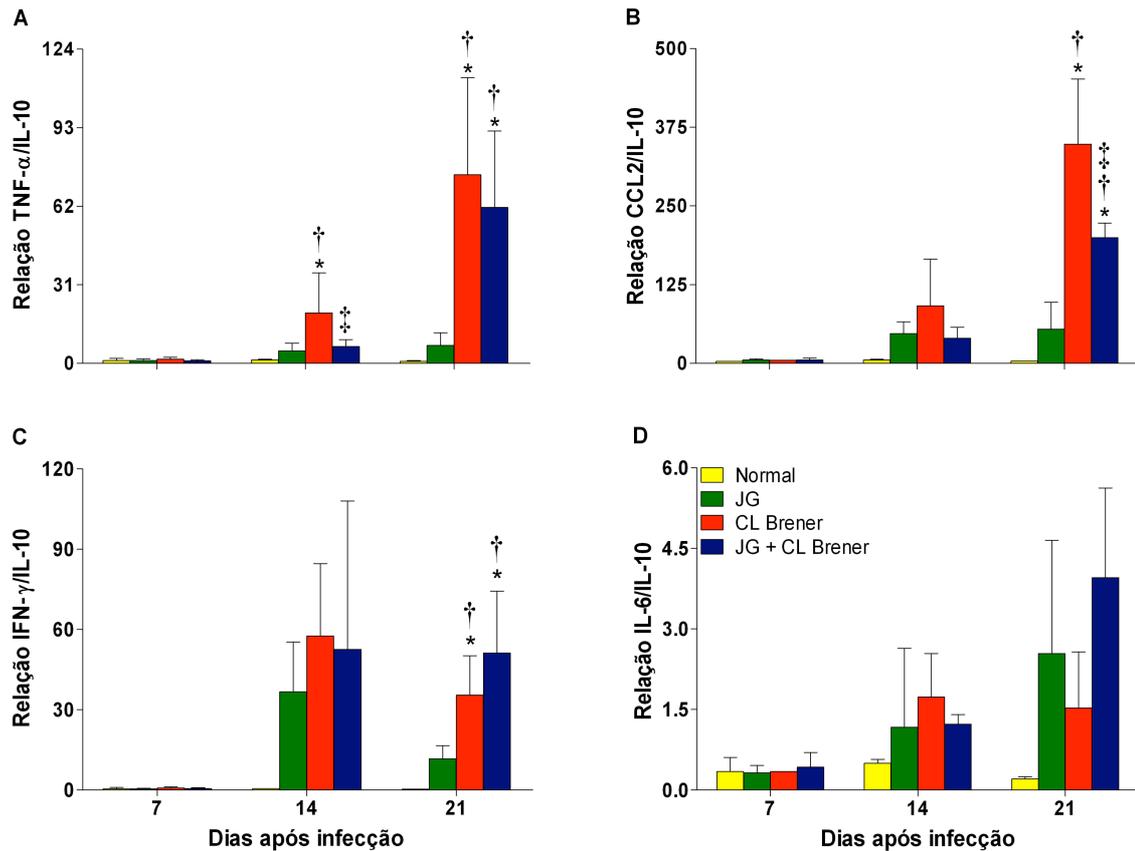


GRÁFICO 4 - Relação TNF- $\alpha$ /IL-10, CCL2/IL-10, IFN- $\gamma$ /IL-10 e IL-6/IL-10 em 7, 14 e 21 dias após a infecção. As infecções foram feitas como descrito no GRAF. 1 e as relações entre os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , CCL2, IL-6 e IFN- $\gamma$ ) e os níveis séricos de IL-10 foram calculadas para cada animal em 7, 14 e 21 dias após a infecção. Barras como descrito no GRAF. 2. Os valores são expressos como a média aritmética  $\pm$  SEM (dados representativos de dois experimentos independentes,  $n = 3$ ). \*, † e ‡ representam  $p < 0,05$  em relação aos grupos: normal, JG e CL Brener, respectivamente.

## V.6. Avaliação do perfil de expressão de citocinas por células esplênicas

A avaliação do perfil de expressão de citocinas por células esplênicas foi realizada por citometria de fluxo em amostras de baço coletadas durante a fase aguda da infecção. Imediatamente após a coleta dos órgãos, foi feita uma avaliação da intensidade da esplenomegalia, através da determinação da massa total de cada baço em balança de precisão. Como esperado, foi observada esplenomegalia com magnitude crescente entre animais infectados com JG e/ou CL Brener durante o curso da infecção (GRAF. 5A). A seguir, suspensões de células esplênicas foram obtidas, a concentração de células foi determinada e um aumento significativo no número total de células esplênicas/baço, paralelo àquele observado na massa total do órgão, foi detectado entre camundongos infectados com JG e/ou CL Brener em relação a animais normais em 14 e 21 dias após a infecção (GRAF. 5B).

O perfil de expressão de citocinas por células MAC-3<sup>+</sup>, células NK e células T esplênicas também foi avaliado durante o curso da infecção. MAC-3 é um marcador expresso principalmente por células da linhagem monocítica, seu nível de expressão alcança o máximo em macrófagos, mas células dendríticas e endoteliais também expressam esse marcador em sua superfície. A análise da expressão intracelular de TNF- $\alpha$  por células que apresentaram alta expressão do marcador MAC-3 revelou um aumento significativo nas contagens de células MAC-3<sup>+</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> no 14º dia após a infecção entre animais infectados com JG e/ou CL Brener em relação a animais normais. Curiosamente, esse aumento permaneceu com a mesma magnitude até o 21º dia após a infecção apenas entre camundongos infectados com JG, pois uma redução significativa no número de células MAC-3<sup>+</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> foi observada entre os animais infectados CL Brener ou coinfectados (GRAF. 6A).

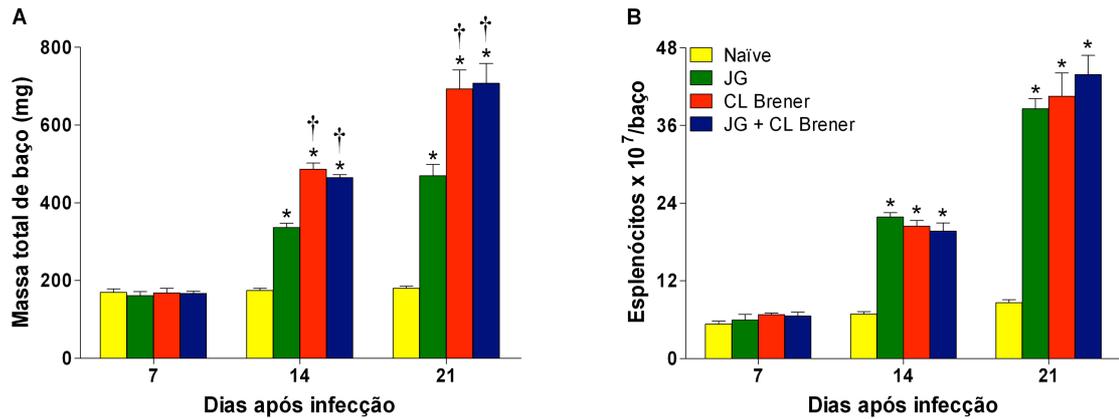


GRÁFICO 5 - Avaliação da massa de baço e número de esplenócitos/baço em 7, 14 e 21 dias após a infecção de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener. As infecções foram feitas como descrito no GRAF. 1, os animais foram sacrificados em 7, 14 e 21 dias após a infecção, o baço de cada animal foi removido e sua massa total (mg) determinada em balança analítica de precisão. A seguir, as amostras de baço foram maceradas para a obtenção de células esplênicas, a concentração de células foi determinada em câmara de Neubauer convencional e o número de esplenócitos por baço calculado. Barras como descrito no GRAF. 2. Os valores são expressos como a média aritmética  $\pm$  SEM (dados representativos de dois experimentos independentes,  $n = 3$ ). \* e † representam  $p < 0,05$  em relação aos grupos: normal e JG, respectivamente.

Em relação à contagem de células MAC-3<sup>+</sup> IL-12<sup>+</sup> esplênicas, foi detectado um aumento gradual e significativo entre animais infectados com JG e/ou CL Brener em relação a animais normais a partir do 14º dia após a infecção (GRAF. 6B). Além disso, um aumento significativo do número de células MAC-3<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> também foi observado entre animais infectados com JG e/ou CL Brener em relação a animais normais em 14 e 21 dias após a infecção. É importante ressaltar que a magnitude desse aumento foi significativamente maior entre animais coinfectados em relação aos demais grupos experimentais (GRAF. 6C).

O perfil de ativação de algumas populações de células esplênicas também foi avaliado por citometria de fluxo, através da análise da expressão do marcador de ativação CD69. Como esperado no contexto da infecção por *T. cruzi*, houve um aumento significativo no número de células NK expressando o marcador de ativação CD69 entre camundongos infectados com JG e/ou CL Brener durante o curso da infecção em relação a animais normais. Interessantemente, a magnitude desse aumento foi significativamente maior entre camundongos infectados com JG em relação a animais infectados com CL Brener no 21º dia após a infecção (GRAF. 7A). A elevação no número de células T CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> esplênicas foi mais tardia, sendo detectada apenas no 14º e 21º dia após a infecção entre animais infectados com CL Brener ou coinfectados. Entre animais infectados com JG o aumento no número de células T CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> esplênicas foi detectado ainda mais tardiamente, em 21 dias após a infecção, mas com uma magnitude semelhante àquela observada entre animais infectados com CL Brener ou coinfectados (GRAF. 8A). Um aumento tardio foi detectado no número de células T CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> esplênicas entre animais infectados com JG e/ou CL Brener. No 14º dia após a infecção, um aumento significativo na população de células T CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> esplênicas foi observado apenas entre animais coinfectados em relação aos demais grupos experimentais. No 21º dia após a infecção, uma significativa elevação no número de células T CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup>

esplênicas foi observada entre animais infectados com JG e/ou CL Brener em relação a camundongos normais (GRAF. 9A).

Em relação à expressão intracelular das citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por células NK esplênicas, foi observado um aumento significativo, persistente e com magnitude similar no número de células NK expressando ambas as citocinas entre animais infectados com JG e/ou CL Brener em relação a animais normais em 14 e 21 dias após a infecção (GRAF. 7B e C). Em relação às células T esplênicas, foi observado um perfil de expressão de citocinas similar àquele relatado para células NK. Em 14 e 21 dias após a infecção, foi observado um aumento significativo no número de células T CD4 expressando TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 entre animais infectados com JG e/ou CL Brener em relação a camundongos normais. É importante ressaltar que no 14º dia após a infecção, foi observado um aumento significativo na intensidade de expressão de IL-10 entre animais coinfectados em relação a camundongos infectados com JG ou CL Brener (GRAF. 8B - D). Houve também um aumento significativo no número de células T CD8 expressando TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 entre camundongos infectados com JG e/ou CL Brener em relação a animais normais em 14 e 21 dias após a infecção. Contrastando com a população de células T CD4, a magnitude do aumento do número de células T CD8 expressando TNF- $\alpha$  foi significativamente maior entre animais infectados com CL Brener em relação aos demais grupos experimentais (GRAF. 9B - D).

É importante dizer que as populações de células esplênicas, provenientes de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener, avaliadas por citometria de fluxo não apresentaram nenhuma polarização Th1/Th2 clara sendo, portanto, caracterizadas por um perfil de expressão de citocinas misto durante a fase aguda da infecção.

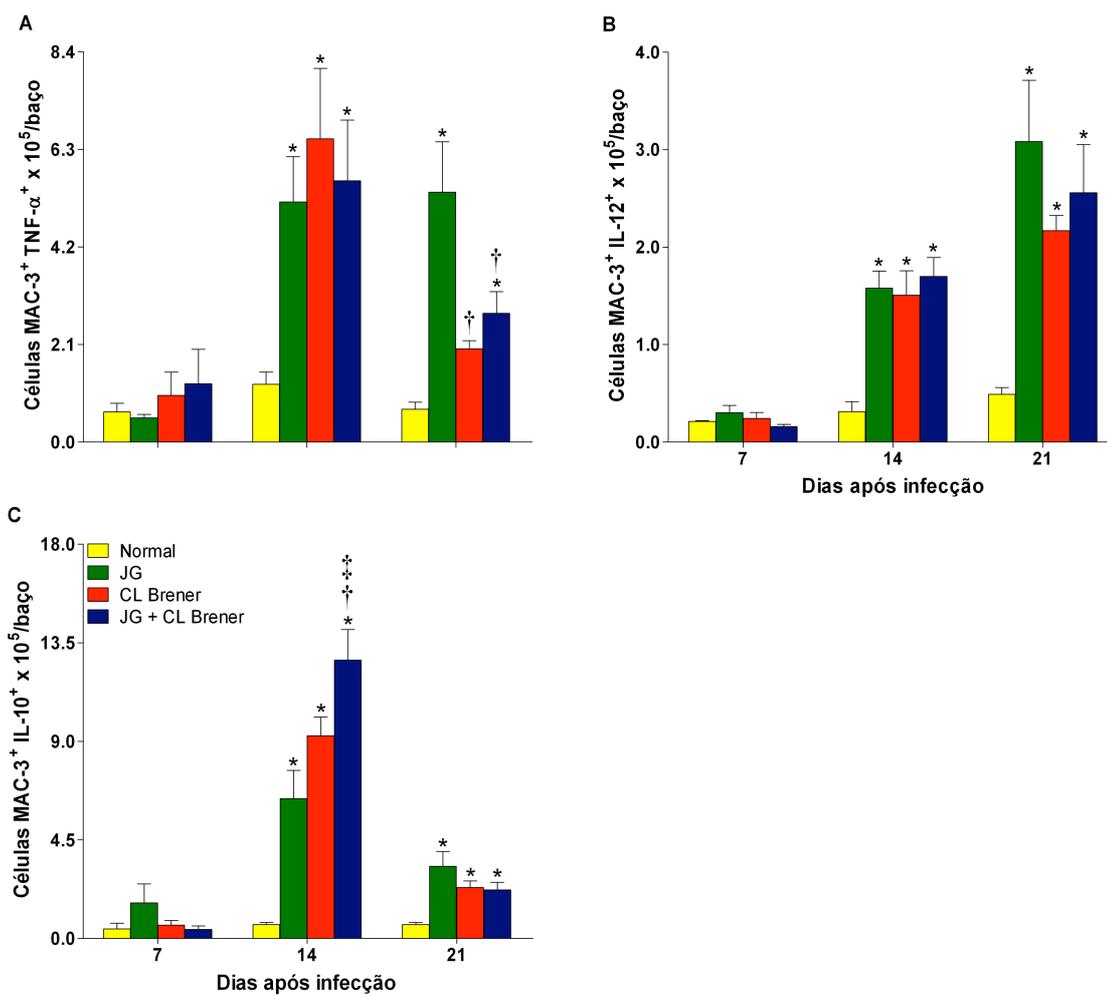


GRÁFICO 6 - Análise do perfil de expressão de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10 por células esplênicas MAC-3<sup>+</sup> provenientes de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener. As infecções foram feitas como descrito no GRAF. 1 e os animais sacrificados em 7, 14 e 21 dias após a infecção. Barras como descrito no GRAF. 2. Os valores são expressos como a média aritmética  $\pm$  SEM (dados representativos de dois experimentos independentes,  $n = 3$ ). \*, † e ‡ representam  $p < 0,05$  em relação aos grupos: normal, JG e CL Brener, respectivamente.

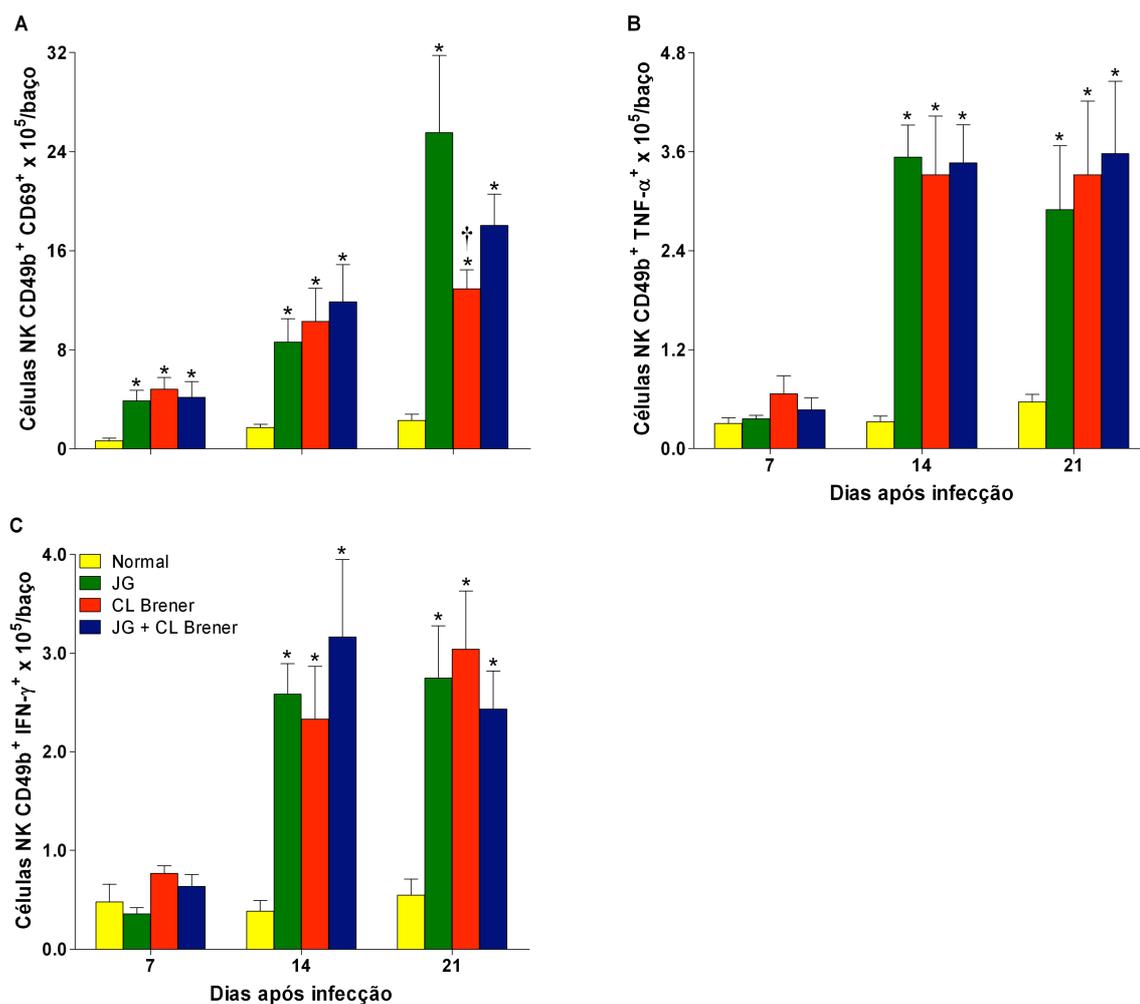


GRÁFICO 7 - Análise do perfil de expressão de CD69, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por células NK esplênicas provenientes de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener. As infecções foram feitas como descrito no GRAF. 1 e os animais sacrificados em 7, 14 e 21 dias após a infecção. Barras como descrito no GRAF. 2. Os valores são expressos como a média aritmética  $\pm$  SEM (dados representativos de dois experimentos independentes, n = 3). \* e † representam  $p < 0,05$  em relação aos grupos: normal e JG, respectivamente.

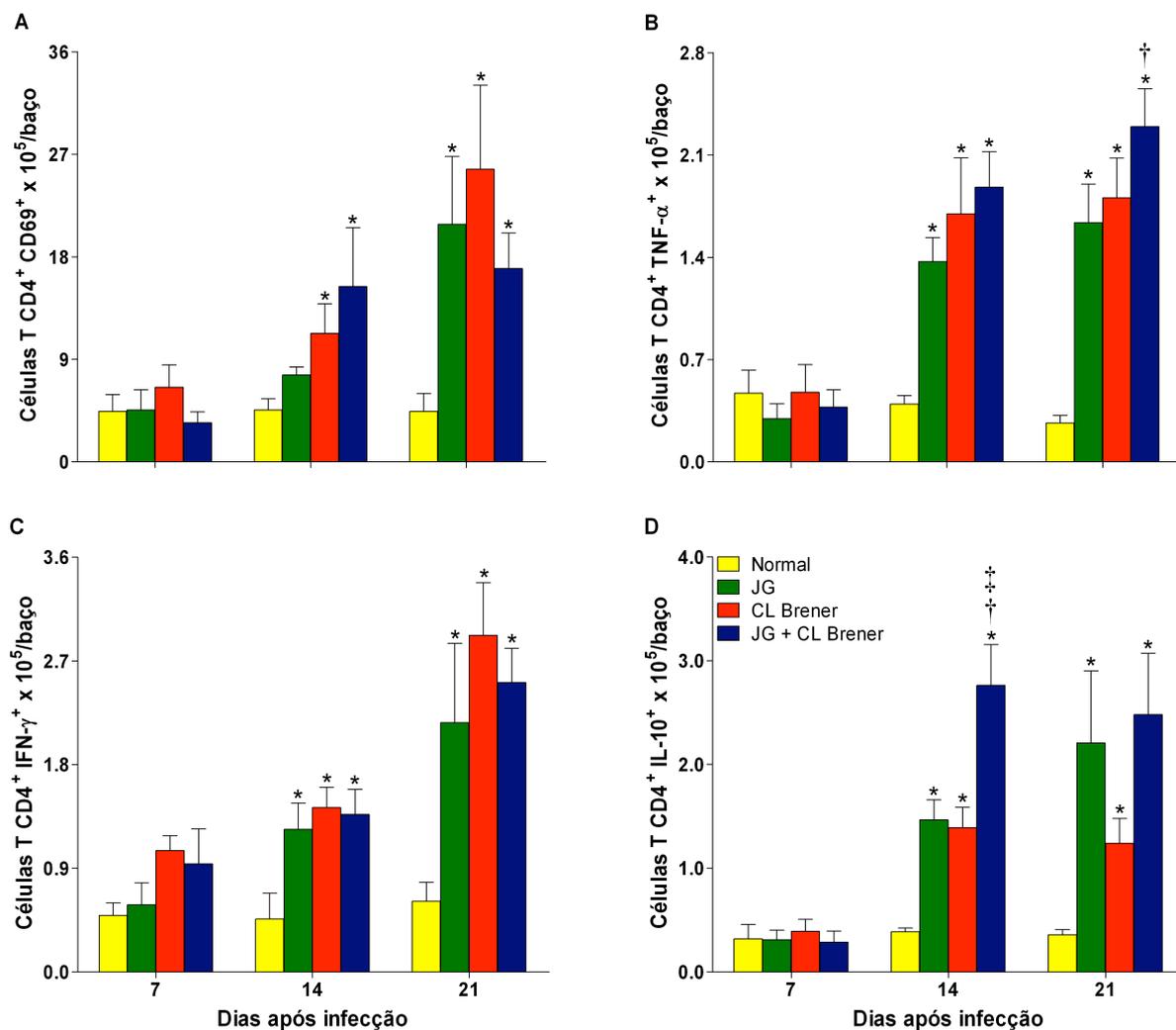


GRÁFICO 8 - Análise do perfil de expressão de CD69, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 por células T CD4<sup>+</sup> esplênicas provenientes de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener. As infecções foram feitas como descrito no GRAF. 1 e os animais sacrificados em 7, 14 e 21 dias após a infecção. Barras como descrito no GRAF. 2. Os valores são expressos como a média aritmética  $\pm$  SEM (dados representativos de dois experimentos independentes,  $n = 3$ ). \*, † e ‡ representam  $p < 0,05$  em relação aos grupos: normal, JG e CL Brener, respectivamente.

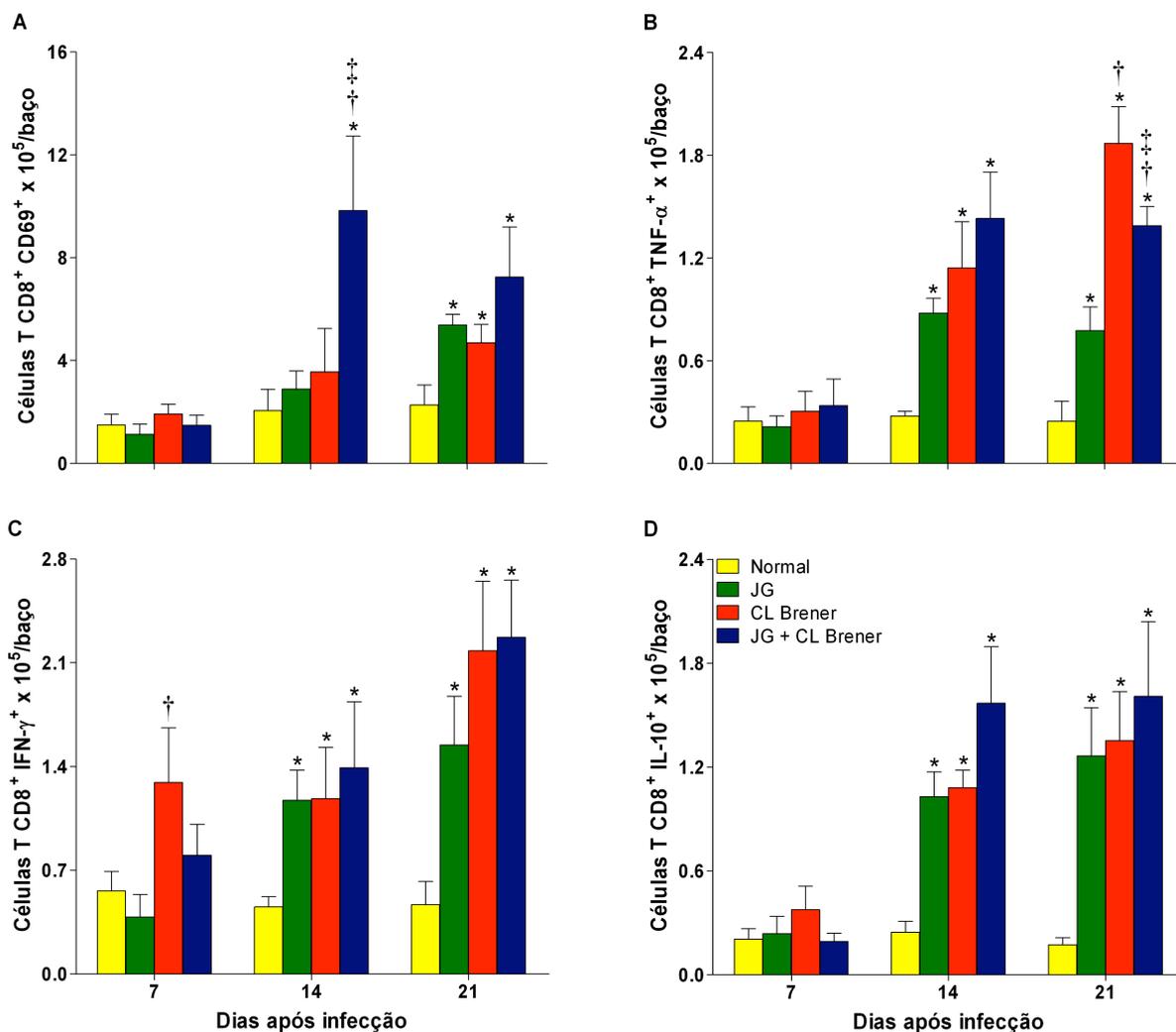


GRÁFICO 9 - Análise do perfil de expressão de CD69, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 por células T CD8<sup>+</sup> esplênicas provenientes de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener. As infecções foram feitas como descrito no GRAF. 1 e os animais sacrificados em 7, 14 e 21 dias após a infecção. Barras como descrito no GRAF. 2. Os valores são expressos como a média aritmética  $\pm$  SEM (dados representativos de dois experimentos independentes, n = 3). \*, † e ‡ representam  $p < 0,05$  em relação aos grupos: normal, JG e CL Brener, respectivamente.

## VI. DISCUSSÃO

Apesar de um século de intensa investigação científica, a doença de Chagas (DC) ainda constitui um grave problema de saúde pública na América Latina. A dinâmica de transmissão de *T. cruzi* e a prevalência da DC são influenciadas por diferentes fatores, entre os quais se destacam: 1) *fatores biológicos*, que incluem cada elo da cadeia de transmissão do parasito; 2) *fatores ecológicos*, que compreendem as condições ambientais que favorecem ou dificultam a transmissão do parasito; 3) *fatores socioeconômicos*, que determinam as atitudes e comportamentos de grupamentos humanos em relação à doença; bem como 4) *fatores políticos*, que em última instância determinam as estratégias de controle da doença. Além disso, a ameaça de surtos de DC em áreas não-endêmicas, bem como de casos novos da doença em áreas endêmicas, onde se acreditava que a transmissão do parasito havia sido controlada, apontam para a necessidade crítica de: 1) programas de controle da transmissão vetorial, que atendam todos os países com transmissão ativa de *T. cruzi*; 2) adoção de medidas de segurança em bancos de sangue em áreas consideradas não-endêmicas, a fim de prevenir a transmissão via transfusão sanguínea; 3) controle de possíveis reservatórios não-humanos de *T. cruzi* domiciliados; 4) melhoramento das condições socioeconômicas de populações em risco de contrair a infecção; 5) desenvolvimento de novos métodos que permitam fazer um prognóstico da evolução clínica da doença; 6) desenvolvimento de agentes quimioterápicos eficientes especialmente na fase crônica da doença; bem como 7) identificação de alvos para imunoterapia. Obviamente, para alcançar esses objetivos serão necessárias abordagens multidisciplinares (DUTRA *et al.*, 2009).

Como discutido previamente, embora a fase aguda da doença seja caracterizada por elevada carga parasitária, a maioria dos indivíduos infectados apresenta-se assintomática, o que representa um enorme obstáculo tanto para o diagnóstico precoce e tratamento da doença

quanto para a compreensão da patogênese da DC na fase inicial da infecção. De fato, a maior parte da informação científica relacionada à fase aguda da infecção por *T. cruzi* foi obtida em modelos experimentais, em particular o murino. Por outro lado, a demonstração da existência de infecções concomitantes por diferentes clones do parasito, tanto em hospedeiros invertebrados quanto vertebrados, em condições naturais sugere que a variabilidade genética da população de *T. cruzi* infectante pode apresentar um papel relevante no contexto da DC. Entretanto, a maioria dos trabalhos experimentais envolve infecções com uma única população do parasito e se restringem à análise de relativamente poucos parâmetros biológicos. Portanto, a fim de ajudar a preencher essa lacuna na literatura científica, no presente trabalho foi investigado, com maior profundidade, os efeitos da associação de duas populações de *T. cruzi* (*JG* e *CL Brener*) com virulência e patogenicidade opostas em camundongos *BALB/c*, através da análise simultânea de múltiplos parâmetros biológicos durante a fase aguda da infecção.

O inóculo, um dos principais fatores capazes de influenciar as manifestações clínicas desencadeadas pela infecção por *T. cruzi*, em condições naturais é geralmente pequeno e significativamente menor que àquele comumente usado em condições experimentais, que pode alcançar 10.000 parasitos ou mais por animal. Portanto, a fim de aproximar as condições experimentais à condição natural na qual ocorre a infecção por *T. cruzi*, no presente trabalho camundongos *BALB/c* machos com 6 a 8 semanas foram infectados com 100 formas tripomastigotas de *JG* ou *CL Brener*; ou coinfetados com 50 tripomastigotas de cada uma das respectivas populações de *T. cruzi*. Desse modo, os diferentes grupos experimentais foram infectados com 100 formas tripomastigotas do parasito, uma quantidade muito menor que àquela comumente usada em modelos experimentais da doença. A evolução da parasitemia, massa corporal e sobrevivência foi avaliada até 61 dias após a infecção. Alternativamente, os

animais foram sacrificados em 7, 14 e 21 dias após a infecção para avaliação de parâmetros parasitológicos, hematológicos, histopatológicos e imunológicos.

A avaliação da parasitemia e a análise parasitismo cardíaco revelaram grandes diferenças na carga parasitária entre animais infectados com JG e/ou CL Brener durante a fase aguda da infecção. Enquanto, camundongos infectados com JG apresentaram baixos níveis de parasitemia e parasitismo cardíaco; animais infectados com CL Brener apresentaram altos níveis de parasitemia e parasitismo cardíaco. Por outro lado, camundongos coinfetados com JG e CL Brener apresentaram níveis de parasitemia e parasitismo cardíaco intermediários àqueles observados entre animais infectados com JG ou CL Brener, o que sugere uma possível interferência de JG na replicação de CL Brener. É importante ressaltar que esses achados não podem ser explicados apenas por diferenças no inóculo usado, pois resultados semelhantes foram observados entre camundongos infectados com 50 ou 100 formas tripomastigotas de CL Brener na infecção simples. Em relação à caracterização molecular do parasito, diretamente em amostras de tecido cardíaco provenientes de animais coinfetados por PCR, foi observada uma predominância relativa de CL Brener variando de 50 a 100% em todas as amostras analisadas dependendo da técnica e do intervalo de tempo após a infecção. Embora a frequência relativa de JG tenha sido sempre menor que a de CL Brener, foi observado um discreto aumento na presença de JG em amostras de tecido cardíaco coletadas de animais coinfetados no decorrer da infecção. Isso levanta a possibilidade de que a frequência de JG poderia aumentar se a infecção fosse acompanhada até a fase crônica, conforme relatado previamente por Franco *et al.*, (2003). A predominância relativa de uma das populações de *T. cruzi* em amostras de tecido cardíaco provenientes de animais coinfetados com JG e CL Brener parece ser influenciada por aspectos genéticos tanto do parasito quanto do hospedeiro. De fato, várias linhas de evidência mostram claramente que tanto a população de *T. cruzi* quanto a linhagem de camundongo usada em modelos

experimentais da doença podem interferir em diferentes parâmetros biológicos e influenciar a evolução clínica da doença (WRIGHTSMAN *et al.*, 1982; ANDRADE *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2009).

No presente trabalho, a gravidade da doença desencadeada pela infecção por *T. cruzi* em camundongos BALB/c foi avaliada através do acompanhamento da perda de massa corporal, avaliação do dano ao tecido cardíaco e sobrevivência durante a fase aguda da infecção. Enquanto, a infecção de camundongos BALB/c por JG foi caracterizada por ausência de sintomas evidentes de doença, miocardite aguda moderada e mortalidade nula; animais infectados com CL Brener apresentaram sinais de toxemia, tais como: arrepiamento de pêlos, anorexia, prostração, letargia (sonolência e apatia), e caquexia, bem como miocardite aguda grave e elevada taxa de mortalidade. Embora camundongos coinfectedos tenham apresentado sintomas semelhantes àqueles observados entre animais infectados com CL Brener, os sinais de toxemia apareceram um pouco mais tarde e com menor intensidade. Além disso, houve uma atenuação significativa do dano ao tecido cardíaco, redução da taxa de mortalidade e aumento do tempo de sobrevivência médio entre animais coinfectedos em relação àqueles infectados apenas com CL Brener.

É importante ressaltar que Franco *et al.* (2003), trabalhando com ratos *Holtzman* infectados com essas mesmas populações de *T. cruzi* (JG e CL Brener), relataram resultados similares àqueles relatados no presente estudo em relação às manifestações clínicas da doença, gravidade do dano ao miocárdio e taxas de mortalidade. De fato, ratos *Holtzman* infectados com JG apresentaram miocardite aguda moderada e mortalidade nula. Enquanto, aqueles infectados com CL Brener apresentaram miocardite aguda grave com alta taxa de mortalidade. Por outro lado, a coinfeção de ratos *Holtzman* com JG e CL Brener resultou em taxa de mortalidade muito baixa ou nula e significativa atenuação do dano ao tecido cardíaco durante o curso da infecção. Além disso, similarmente ao que foi relatado no presente estudo,

Franco *et al.* (2003) observaram um aumento progressivo, porém muito mais acentuado, na proporção de JG em relação à CL Brener em amostras de tecido cardíaco provenientes de ratos Holtzman coinfectados com as respectivas populações de *T. cruzi*. De fato, CL Brener foi sendo eliminada ou reduzida a níveis indetectáveis em amostras de tecido cardíaco provenientes de ratos infectados apenas com CL Brener ou coinfectados, mas permanecendo no músculo estriado esquelético durante o curso da infecção (FRANCO *et al.*, 2003).

Seja qual for o modelo experimental estudado, a resposta inflamatória desencadeada pela infecção envolve o recrutamento coordenado de componentes sanguíneos (plasma e leucócitos) para o sítio inflamatório. A interação entre vários mediadores inflamatórios coordena essa complexa resposta biológica fundamental para a manutenção da homeostase e sobrevivência do organismo. A concentração de cada componente sanguíneo (molecular ou celular) é mantida dentro de limites fisiológicos bem definidos em condições normais; perturbações nesse delicado balanço fisiológico podem manifestar-se clinicamente e serem correlacionadas a vários estados patológicos. Em acordo com essa concepção, foram observadas várias alterações quantitativas em diferentes parâmetros hematológicos avaliados em amostras de sangue periférico provenientes de animais infectados com JG e/ou CL Brener durante a fase aguda da infecção. Leucopenia moderada em 7 (entre camundongos infectados com JG ou CL Brener) e intensa em 14 (entre animais infectados com CL Brener ou coinfectados) dias após a infecção pode ser explicada pelo recrutamento intenso de leucócitos para sítios inflamatórios localizados em vários compartimentos anatômicos do organismo, o que é normal na fase aguda da infecção por *T. cruzi*. É importante ressaltar, que o retorno das contagens de leucócitos sanguíneos, entre animais infectados com CL Brener ou coinfectados, a níveis próximos ao basal em 21 dias após a infecção foi principalmente devido ao aumento significativo nas contagens de neutrófilos segmentados e neutrófilos bastonetes circulantes. Chen *et al.* (2001) estudaram os efeitos da depleção de neutrófilos na proteção *versus*

exacerbação da infecção por *T. cruzi* em camundongos BALB/c e C57BL/6 tratados com mAb anti-neutrófilo. A depleção seletiva de neutrófilos em camundongos BALB/c, através da administração de mAb anti-neutrófilo 24 h antes da infecção com a cepa Tulahuén de *T. cruzi*, resulta em exacerbação da doença, diminuição da expressão de genes que codificam citocinas Th1 (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e aumento da expressão de IL-10, uma citocina Th2, por células esplênicas especialmente 24 h após a infecção. Neutrófilos provenientes de camundongos BALB/c tratados com mAb controle (IgG) infectados com *T. cruzi* apresentaram alta expressão de genes que codificam citocinas Th1 (IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas (MIG e MIP-1 $\alpha$ ) com atividade quimioatraente para células Th1. Em contraste, a depleção de neutrófilos em camundongos C57BL/6 aumentou a resistência à doença e acentuou tanto a produção de citocinas Th1 quanto da IL-10 em relação a animais da mesma linhagem tratados com anticorpo controle (CHEN *et al.*, 2001). Na clínica, leucocitose neutrofílica com desvio à esquerda, uma reação característica de processos infecciosos, apresenta grande valor prognóstico, pois a evolução clínica do paciente tende a piorar à medida que aumenta o número de formas circulantes imaturas de neutrófilos.

Interessantemente, foi observada uma intensa linfopenia no 14º dia após a infecção entre animais infectados com CL Brener ou coinfetados, o que persistiu até 21 dias após a infecção. Além disso, também foi observada significativa monocitopenia e eosinopenia entre animais infectados com CL Brener ou coinfetados durante o curso da infecção. A linfopenia, monocitopenia e eosinopenia podem ser explicadas por um aumento no recrutamento de linfócitos, eosinófilos e monócitos para diferentes compartimentos anatômicos do organismo em resposta à infecção e ao dano tecidual associado à resposta inflamatória desencadeada pelo parasito. O retorno das contagens de eosinófilos e monócitos a níveis próximos ao basal durante o curso da infecção pode ser devido a um aumento compensatório em sua produção na medula óssea e liberação para a corrente circulatória. Várias linhas de evidência mostram

que a infecção por *T. cruzi* pode desencadear profundas alterações no sistema hematopoiético, devido à sua capacidade de interferir na hematopoiese, liberação de elementos figurados (hemácias, plaquetas e leucócitos) da medula óssea para o sangue, bem como no recrutamento de leucócitos para sítios inflamatórios em diferentes compartimentos anatômicos do organismo. De fato, Marcondes *et al.* (2000) relataram alterações hematológicas graves, entre as quais: pancitopenia, caracterizada por redução nas contagens de plaquetas, hemácias e leucócitos circulantes e hipoplasia de medula óssea, caracterizada por uma diminuição significativa no número de células precursoras, em particular eritroblastos (precursores de hemácias) e megacarioblastos (precursores de plaquetas), em camundongos C3H infectados com a cepa CL de *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção. Além disso, as graves alterações hematológicas desencadeadas pela infecção por *T. cruzi* em camundongos C3H foram acompanhadas por carga parasitária e taxa de mortalidade elevadas (MARCONDES *et al.*, 2000). No presente trabalho, também foi observada uma diminuição significativa na concentração de hemoglobina, valor hematócrito, bem como nas contagens de hemácias circulantes entre animais infectados apenas com CL Brener ou coinfectedos em 21 dias após a infecção, caracterizando um estado de anemia, uma condição que sabidamente compromete a sobrevivência do hospedeiro durante o curso da infecção, o que também pode explicar parcialmente as elevadas taxas de mortalidade observadas particularmente nesses grupos experimentais. É importante ressaltar que as hemácias mantêm sua viabilidade por 1 a 2 meses após serem liberadas da medula óssea para a corrente circulatória, mas animais infectados com CL Brener ou coinfectedos apresentaram anemia precocemente, o que sugere uma diminuição na expectativa de vida dessas células sanguíneas durante o curso da infecção, como proposto anteriormente por Marcondes *et al.* (2000). Portanto, uma redução na expectativa de vida das hemácias suficiente para provocar uma redução significativa nas contagens de células circulantes deveria ser considerada um fator adicional que contribui para

a anemia e conseqüentemente para a sobrevivência de hospedeiros infectados por *T. cruzi*. Várias linhas de evidência sugerem que alterações hematológicas associadas à infecção podem ser devidas à atividade imunossupressora de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\alpha/\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e MIP-1  $\alpha$ ) liberadas sistemicamente em grandes quantidades (MOLDAWER *et al.*, 1989; COOK, 1996; BINDER *et al.*, 1997; BINDER *et al.*, 1998).

Um passo essencial para assegurar a sobrevivência do parasito e o sucesso da infecção envolve a invasão de células do hospedeiro. De fato, o *T. cruzi* é capaz de infectar uma ampla variedade de células do hospedeiro, mas a persistência desse parasito tanto em células musculares lisas quanto em células musculares estriadas cardíacas é certamente um aspecto chave na evolução e manifestação clínica da doença. Moléculas expressas na superfície tanto do parasito quanto de células hospedeiras são essenciais para o processo de invasão celular. Além disso, várias moléculas expressas na superfície do parasito são capazes induzir forte resposta imune inata durante a fase inicial da infecção (AKIRA *et al.*, 2006; GAZZINELLI & DENKERS, 2006; TARLETON, 2007; TRINCHIERI & SHER, 2007). As interações parasito-hospedeiro são cruciais tanto para o controle da carga parasitária na fase inicial da infecção, enquanto a resposta imune adaptativa mediada por linfócitos T e B se desenvolve, quanto para o estabelecimento de um microambiente rico em citocinas capazes de influenciar a resposta imune adaptativa subsequente, que é crucial para a manutenção do controle da carga parasitária, regulação da resposta inflamatória desencadeada pela infecção, manutenção da homeostase tecidual e sobrevivência do hospedeiro durante o curso da infecção (AKIRA *et al.*, 2006; GAZZINELLI & DENKERS, 2006). Com essa perspectiva, foi avaliada a resposta imune de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener através da análise simultânea de diferentes parâmetros imunológicos durante a fase aguda da infecção.

A resposta imunológica tem um papel incontestável na proteção contra doenças infecciosas, mas sob certas circunstancias pode apresentar efeitos colaterais adversos capazes

de causar extensas lesões teciduais e graves alterações patológicas potencialmente fatais para o hospedeiro durante o curso da infecção. De fato, enquanto camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Tulahuén de *T. cruzi* sobrevivem à fase aguda da infecção, animais deficientes em IL-10 com *background* genético de C57BL/6 apresentam manifestações clínicas típicas da síndrome de choque séptico, entre as quais: perda significativa de massa corporal, hipotermia, hipoglicemia, hipercalcemia, coagulação intravascular e hemorragia (hepática e pulmonar), e morrem em três semanas após a infecção, apesar de apresentarem baixa carga parasitária e altos níveis sistêmicos de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ ) e produtos do metabolismo do NO (HÖLSCHER *et al.*, 2000). Além disso, Hölscher *et al.* (2000) mostraram que a neutralização de TNF- $\alpha$  através da administração de anti-TNF- $\alpha$  não apenas atenua a progressão da doença, mas também aumenta a expectativa de vida de animais C57BL/6 deficientes em IL-10 infectados com *T. cruzi*. A patogênese da sepse é complexa e multifatorial sendo influenciada tanto pelo agente infeccioso quanto pela intensidade da resposta inflamatória desencadeada pela infecção (TAB. 8). Recentemente, tem sido sugerido que a resposta imune que ocorre durante a sepse resulta do interrelacionamento entre dois fenômenos contrastantes relacionados à inflamação. A fase inicial da sepse ou síndrome da resposta inflamatória sistêmica é caracterizada por uma produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios. Essa resposta inicial é então progressivamente suprimida pela produção de mediadores anti-inflamatórios, o que pode levar à imunossupressão resultando em perda da capacidade de controlar a infecção e falência múltipla de órgãos, o que resulta em elevadas taxas de mortalidade. Uma fase intermediária, caracterizada por um perfil inflamatório misto, tem sido descrita.

TABELA 8 - Definições importantes no contexto da sepse.

	<i>Definição</i>
<i>Infecção</i>	Invasão de tecidos do hospedeiro normalmente estéreis por agentes infecciosos.
<i>Sepse</i>	Resposta inflamatória sistêmica à infecção, caracterizada por duas ou mais das seguintes manifestações clínicas: 1) Temperatura corporal: > 38 ou < 36°C; 2) Frequência cardíaca: > 90 batimentos/min; 3) Frequência respiratória: > 20 respirações/min ou necessidade de suporte respiratório; 4) Contagem global de leucócitos (sangue): > 12.000 ou < 4.000/mm <sup>3</sup> .
<i>Sepse grave</i>	Sepse associada à disfunção múltipla de órgãos, hipoperfusão ou hipotensão.
<i>Choque séptico</i>	Hipotensão (pressão arterial sistólica < 90 mmHg) induzida por sepse com necessidade ou não de vasoconstritores.
<i>Falência múltipla de órgãos</i>	Presença de alterações funcionais de vários órgãos de modo que a homeostase não pode ser mantida sem intervenção.

Modificado a partir de Webster & Galley, 2009.

Em pacientes sépticos, bactérias gram-negativas são os principais agentes isolados. Entretanto, vírus, bactérias gram-positivas, fungos e protozoários também são potencialmente capazes de induzir sepse semelhante àquela provocada por bactérias gram-negativas. A alta taxa de mortalidade associada ao choque séptico resulta principalmente de colapso hemodinâmico e falência múltipla de órgãos, os quais podem ser induzidos por estímulos extrínsecos, tais como: exotoxinas, endotoxinas, proteínas e proteases; ou intrínsecos, tais como: aminas e peptídeos vasoativos, fragmentos liberados durante a ativação da cascata do complemento, prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas proteolíticas (HOTCHKISS & KARL, 2003; JEAN-BAPTISTE, 2007; WEBSTER & GALLEY, 2009).

A resposta imune anti-infecciosa pode induzir intensa liberação de mediadores inflamatórios e a regulação da produção desses mediadores é crucial para a manutenção da homeostase tecidual, pois uma resposta imune muito intensa pode resultar em graves alterações fisiológicas com consequências potencialmente catastróficas para o organismo. De fato, vários agentes infecciosos podem desencadear intensa liberação sistêmica de mediadores inflamatórios (TAB. 9), tais como: TNF- $\alpha$  e IL-1, que são os principais mediadores implicados no colapso circulatório desencadeado por choque séptico (HOTCHKISS & KARL, 2003; JEAN-BAPTISTE, 2007; WEBSTER & GALLEY, 2009).

O curso da infecção entre animais infectados com CL Brener ou coinfetados foi caracterizado por níveis séricos elevados de TNF- $\alpha$ , sintomas de toxemia e altas taxas de mortalidade. O TNF- $\alpha$  é um potente pirógeno endógeno indutor de caquexia e tem um papel central na atividade imunológica, pois apresenta uma ampla variedade de efeitos biológicos.

TABELA 9 - Principais mediadores pró- e anti-inflamatórios envolvidos na sepse.

<i>Mediadores pró-inflamatórios</i>	<i>Ações</i>
TNF- $\alpha$	Febre, hipotensão, síndrome semelhante a choque séptico.
IL-1	Febre, hipotensão, anorexia, sono, ativação céls. T e M $\phi$ s.
IL-6	Produção de proteínas de fase aguda, proliferação T e B.
HMGB-1	Hipotensão, síndrome semelhante a choque séptico.
MIF	↑ produção de TNF- $\alpha$ e expressão de TLR-4.
NO	Relaxamento de músculos lisos, estresse oxidativo.
PAF	Ativação de plaquetas e endotélio vascular.
C3a-C5a	Liberação de histamina, ↑ permeabilidade vascular.
PGE2, PGI2	Vasodilatação.
TXA2	↑ resistência pulmonar.
LTC4, LTD4, LTE4	↑ permeabilidade capilar pulmonar; bronco-espasmo.
<i>Mediadores anti-inflamatórios</i>	<i>Ações</i>
IL-10	Suprime a funções de M $\phi$ s e a secreção de IFN- $\gamma$ e IL-1.
PGI2	Inibe a produção de TNF- $\alpha$ .
Receptores solúveis de TNF- $\alpha$	Competem com receptores de TNF- $\alpha$ de superfície.
Antagonistas do IL-1R	Bloqueiam as ações da IL-1.
HSPs	Promovem a expressão de I $\kappa$ -B ( <i>feedback</i> negativo sobre a ativação de NF $\kappa$ -B), inibe a produção de TNF- $\alpha$ e IL-1.
Fosfatases	Defosforilação de vários substratos citoplasmáticos diminuindo a produção de TNF- $\alpha$ dependente de NF $\kappa$ -B.
Cortisol	Inibição de NF $\kappa$ -B, ↓ produção de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, eicosanóides e NO, estimula a produção de HSPs.

Abreviaturas: HMGB-1 (*high-mobility group box-1 protein*): proteína de alta mobilidade do grupo 1; HSP (*Heat shock protein*): Proteínas de choque tóxico; I $\kappa$ -B (*inhibitory  $\kappa$ -B*): inibidor do NF- $\kappa$ B; IL (*interleukin*): interleucina; IFN (*interferon*): interferon; M $\phi$ s (*macrophages*): macrófagos; LT (*leukotriene*): leucotrieno; MIF (*macrophage migratory inhibitory factor*): fator inibidor da migração de macrófagos; NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ -B*): fator nuclear  $\kappa$ -B; NO (*nitric oxide*): óxido nítrico; PAF (*platelet-activating factor*): fator ativador de plaquetas; PG (*prostaglandin*): prostaglandina, PGI (*prostacyclin*): prostaciclina; TLR (*toll-like receptor*): receptor tipo *Toll*; TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*): fator de necrose tumoral alfa; TXA (*thromboxane*): tromboxano (adaptado a partir de Jean-Baptiste, 2007).

O TNF- $\alpha$  é um dos principais mediadores pró-inflamatórios produzidos por fagócitos mononucleares e é capaz de ativar múltiplas vias intracelulares de transdução de sinais induzindo ou reprimindo a expressão de genes que codificam fatores de transcrição, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, receptores, bem como proteínas de fase aguda. Devido à suas múltiplas ações pleiotrópicas, o TNF- $\alpha$  apresenta um papel crítico no contexto de respostas inflamatórias que se manifestam sistemicamente e é um marcador bem conhecido da sepse (TRUYENS *et al.*, 1995; HÖLSCHER *et al.*, 2000; WEBSTER & GALLEY, 2009). No presente estudo, camundongos BALB/c infectados com JG apresentaram níveis séricos de TNF- $\alpha$  similares àqueles observados entre animais normais e nenhuma manifestação clínica de toxemia, pelo menos durante a fase aguda da infecção. Por outro lado, animais infectados apenas com CL Brener ou coinfectados apresentaram níveis séricos elevados de TNF- $\alpha$  associados a graves manifestações clínicas de toxemia e altas taxas de mortalidade. Embora, camundongos BALB/c coinfectados tenham apresentado níveis séricos elevados de TNF- $\alpha$  durante a fase aguda da infecção, a manutenção do balanço entre a produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 durante as duas primeiras semanas após a infecção pode ter prevenido os potenciais efeitos tóxicos desencadeados pela liberação sistêmica de TNF- $\alpha$ . Isso pode ajudar a explicar o aparecimento mais tardio de sintomas de toxemia a taxa de mortalidade intermediária observada entre animais coinfectados em relação àqueles infectados com JG ou CL Brener. Esses resultados estão em acordo com várias linhas de evidência sugerindo um papel crítico para a IL-10 na regulação da resposta imune contra *T. cruzi*, devido à sua capacidade de contrabalancear os potenciais efeitos deletérios de mediadores pró-inflamatórios, tais como o TNF- $\alpha$ . Além do TNF- $\alpha$ , foram observados níveis séricos elevados de outros importantes mediadores inflamatórios entre camundongos infectados com CL Brener ou coinfectados. CCL2 (MCP-1), uma quimiocina produzida principalmente por macrófagos em resposta a uma ampla variedade de citocinas, tais como: IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , foi caracterizada como

uma quimiocina específica para monócitos, mas também é capaz de promover o recrutamento de células NK e linfócitos T. No contexto da infecção experimental por *T. cruzi*, Paiva *et al.* (2009) mostraram que, em contraste com animais normais, camundongos deficientes em CCL2 com *background* genético de C57BL/6 apresentam resposta inflamatória tecidual menos intensa, altos níveis sistêmicos de citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10), sinais clínicos compatíveis com uma resposta inflamatória sistêmica, elevada carga parasitária e alta taxa de mortalidade durante a fase aguda da infecção. É importante ressaltar que a resposta inflamatória cardíaca (miocardite) entre camundongos CCL2<sup>-/-</sup> foi caracterizada por infiltrados inflamatórios difusos com uma quantidade menor de linfócitos T CD8 e macrófagos ativados em relação aos animais normais, o que sugere que a quimiocina CCL2 é um mediador chave no recrutamento/ativação de células inflamatórias essenciais para a manutenção do controle da infecção (PAIVA *et al.*, 2009). No presente trabalho, foram observados níveis séricos elevados de CCL2 entre camundongos BALB/c infectados com CL Brener ou coinfetados, o que pode explicar, pelo menos em parte, a intensa miocardite, caracterizada por infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares, relatada entre animais desses grupos experimentais. Por outro lado, o aumento do recrutamento de monócitos para sítios inflamatórios induzido por CCL2, bem como a diferenciação de macrófagos, a partir de monócitos recrutados, certamente representa uma importante alça de *feedback* positivo capaz de promover um aumento na produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos ativados, como sugerido no presente trabalho. Além de produzirem grandes quantidades de TNF- $\alpha$ , macrófagos ativados são uma das principais fontes de IL-6, que promove a diferenciação/ativação de linfócitos T, induz a diferenciação de plasmócitos e a produção de imunoglobulinas (Igs). Além disso, a IL-6 atua como um potente pirógeno endógeno e promove a síntese de proteínas de fase aguda. Em contraste aos seus efeitos pró-inflamatórios, a IL-6 apresenta vários efeitos anti-inflamatórios. A IL-1 e o TNF- $\alpha$  estimulam a produção um do outro e também de IL-6. Por

outro lado, a IL-6 é capaz de inibir a produção tanto de IL-1 quanto de TNF- $\alpha$ , o que representa um importante mecanismo de *feedback* negativo capaz de regular essa cascata inflamatória. Interessantemente, foi observado um aumento significativo nos níveis séricos de TNF- $\alpha$  paralelo à diminuição nos níveis de IL-6 entre animais infectados com CL Brener ou coinfetados durante a fase aguda da infecção.

Como discutido previamente, a produção de NO induzida por IFN- $\gamma$ , que é produzido na fase inicial da infecção por células NK e na fase tardia por células T, é crucial para a atividade tripanocida de macrófagos e sobrevivência do hospedeiro durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. De fato, animais deficientes no receptor de IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R) ou na iNOS com *background* genético de C57BL/6 infectados com a cepa Tulahuén de *T. cruzi* apresentam alta carga parasitária, graves alterações histopatológicas e alta taxa de mortalidade devido à sua incapacidade de controlar a infecção através da produção de NO. Em contraste, a camundongos deficientes em iNOS, que apresentam produção normal de citocinas pró-inflamatórias desencadeada pela infecção por *T. cruzi*, camundongos IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> apresentam um impedimento na produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  tanto *in vivo* quanto *in vitro* após estimulação de células esplênicas com LPS, o que mostra que a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  é dependente de IFN- $\gamma$  (HÖLSCHER *et al.*, 1998). Por outro lado, além de seu papel crítico na proteção contra *T. cruzi*, o IFN- $\gamma$  pode apresentar efeitos colaterais potencialmente deletérios para o hospedeiro devido a sua capacidade de induzir imunossupressão, por um mecanismo dependente da secreção de NO, durante a fase aguda da infecção (GONI *et al.*, 2002). No presente trabalho, altos níveis de IFN- $\gamma$ , com pico no 14º dia após a infecção, foram observados entre animais infectados com CL Brener ou coinfetados, o que pode indicar um possível papel para a imunossupressão nesse modelo da doença.

Além do perfil de citocinas séricas, foi feita a avaliação do padrão de ativação de algumas populações de células esplênicas por citometria de fluxo. Na fase inicial da infecção

por *T. cruzi*, a ativação de mecanismos da imunidade inata é crucial para a defesa do hospedeiro. Em relação à população de células MAC-3<sup>+</sup>, foi observada uma inversão entre as contagens de células MAC-3<sup>+</sup> IL-12<sup>+</sup> e MAC-3<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> entre o 14º e o 21º dia após a infecção, o que pode estar relacionado ao aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios, principalmente TNF- $\alpha$  e CCL2, durante a fase aguda da infecção. Além disso, foi observado um aumento significativo no número de células NK ativadas entre camundongos infectados com JG e/ou CL Brener durante o curso da infecção. Esse aumento começou precocemente e alcançou maior magnitude no 21º dia após a infecção entre animais que apresentaram um melhor controle da carga parasitária, ou seja, animais infectados com JG.

Como esperado no contexto da infecção experimental por *T. cruzi*, o número de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> ativadas aumentou significativamente entre animais infectados com JG e/ou CL Brener em relação a camundongos normais durante a fase aguda da infecção. Entretanto, foi observado um retardo substancial no aparecimento de células T CD8<sup>+</sup> ativadas, exceto entre animais coinfetados, durante a fase aguda da infecção. Apesar de seu papel essencial no controle da infecção por *T. cruzi*, o aparecimento tardio de células T CD8<sup>+</sup> ativadas tem sido amplamente relatado na fase aguda da doença e apontado como um dos principais fatores que permitem o estabelecimento do parasito (TARLETON, 2007). É importante ressaltar que as populações de células esplênicas, provenientes de camundongos BALB/c infectados com JG e/ou CL Brener, avaliadas por citometria de fluxo foram caracterizadas por um perfil misto de expressão de citocinas, não apresentando nenhuma polarização Th1/Th2 clara durante a fase aguda da infecção. Além disso, nem sempre foi possível observar uma completa correspondência entre a contagem de uma determinada população de células esplênicas expressando uma determinada citocina e o nível sérico dessa citocina, mas como estamos lidando com um sistema biológico extremamente complexo, as relações entre essas duas variáveis não são simples.

Tentativas de modelar o comportamento de sistemas biológicos complexos têm sido feitas, mas ainda representam uma enorme simplificação das condições *in vivo* (CALVANO *et al.*, 2005; KEPLER & CHAN, 2007; FOTEINOU *et al.*, 2009). De fato, as análises são feitas em pequena escala, com parâmetros bem controlados. À medida que aumenta a escala, aumenta a complexidade do sistema e o modelo se torna imprevisível. A complexidade em sistemas biológicos emerge do grande número de componentes, bem como das conexões e relacionamento espacial entre os componentes. Apesar de todas as iniciativas, ainda não existe um modelo capaz de descrever satisfatoriamente a dinâmica de sistemas biológicos complexos, tais como o sistema imune (EDELMAN & GALLY, 2001; BAR-YAM & EPSTEIN, 2004; CALVANO *et al.*, 2005; KEPLER & CHAN, 2007; FOTEINOU *et al.*, 2009). No contexto da DC, a complexidade da interação parasito-hospedeiro representa um enorme obstáculo à compreensão da patofisiologia da doença. A avaliação isolada do papel de cada fator potencialmente capaz de influenciar o curso da infecção, frequentemente com pouca reflexão sobre os efeitos combinados dos respectivos fatores, embora compatível com o processo de compreensão humano, que é mais facilmente capaz de visualizar processos complexos como uma série de eventos lineares não tem ajudado a elucidar a patofisiologia da doença. É importante dizer que anormalidades em um único componente de sistemas biológicos complexos raramente têm consequências patológicas, mas os efeitos combinados de anormalidades em múltiplos módulos funcionais podem produzir graves distúrbios sistêmicos. De fato, fenótipos associados a várias doenças humanas manifestam-se por anormalidades em múltiplos módulos funcionais interrelacionados (CALVANO *et al.*, 2005). Portanto, o desenvolvimento de ferramentas que permitam a análise global de redes biológicas complexas pode ajudar a identificar módulos funcionais perturbados durante a evolução clínica de doenças complexas, tais como a DC, e consequentemente melhorar a nossa compreensão da patofisiologia dessas enfermidades.

## VII. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram concluir que:

- A fase aguda da infecção por *JG* em camundongos *BALB/c* foi caracterizada por uma resposta imune balanceada com discreta liberação sistêmica de mediadores inflamatórios, ausência de manifestações clínicas de toxemia, alterações patológicas cardíacas discretas e mortalidade nula.
- A fase aguda da infecção por *CL Brener* em camundongos *BALB/c* foi caracterizada por intensa liberação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias (*TNF- $\alpha$* , *CCL2*, *IL-6*, *IFN- $\gamma$* ), manifestações clínicas de toxemia, alterações patológicas cardíacas graves e alta taxa de mortalidade.
- Em camundongos *BALB/c* coinfectados com *JG* e *CL Brener*, a fase aguda da infecção foi caracterizada pela liberação sistêmica tanto de citocinas pró-inflamatórias (*TNF- $\alpha$* , *CCL2*, *IL-6*, *IFN- $\gamma$* ) quanto de IL-10, um importante mediador anti-inflamatório que aparentemente foi capaz de contrabalancear os efeitos patogênicos potencialmente fatais desencadeados pela resposta inflamatória induzida pela infecção.
- Em conjunto, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem fortemente que a complexidade clonal da população de *Trypanosoma cruzi* infectante pode influenciar significativamente a resposta do hospedeiro e sua sobrevivência durante o curso da infecção.

### VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSOHN, I. A. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res* **31**, 117-121 (1998).

ABRAHAMSOHN, I. A. & COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol* **84**, 231-244 (1996).

AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**, 675-680 (2001).

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).

ALLAIN, J. P.; SUSAN L. STRAMER, S. L.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. *et al.* Transfusion-transmitted infectious diseases. *Biologicals*. **37**, 71-77 (2009).

ANDRADE, L. O. & ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol* **3**, 819-823 (2005).

ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R.; CHIARI, E. *et al.* Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol* **100**, 163-172 (1999).

ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R.; CHIARI, E. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp Parasitol* **100**, 269-275 (2002).

ANONYMOUS. Recommendations from an international symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease, April 11-16 1999, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 429-432 (1999).

ARAUJO, A.; JANSEN, A. M.; REINHARD, K. *et al.* Paleoparasitology of Chagas disease - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104 Suppl 1**, 9-16 (2009).

AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M. *et al.* A 9,000-years record of Chagas' disease. *Proc Nat Acad Sci USA* **101**, 2034-2039 (2004).

AVITSUR, R.; PADGETT, D. A.; SHERIDAN, J. F. Social Interactions, Stress, and Immunity. *Neurol Clin* **24** 483-491 (2006).

BAFICA, A.; SANTIAGO, H. C.; GOLDSZMID, R. *et al.* Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* **177**, 3515-3519 (2006).

BAR-YAM, Y. & EPSTEIN, I. R. Response of complex networks to stimuli. *Proc Nat Acad Sci USA* **101**, 4341-4345 (2004).

BELLOTTI, G.; BOCCHI, E. A.; DE MORAES, A. V. *et al.* In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. *Am Heart J* **131**, 301-307 (1996).

BILATE, A. M. B.; SALEMI, V. M.; RAMIRES, F. J. *et al.* TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Microbes Infect* **9**, 1104-1113 (1998).

BINDER, D.; FEHR, J.; HENGARTNER, H. *et al.* Virus-induced transient bone marrow aplasia: major role of interferon-alpha/beta during acute infection with the noncytopathic lymphocytic choriomeningitis virus. *J Exp Med* **185**, 517-530 (1997).

BINDER, D.; VAN DEN BROEK, M. F.; KAGI, D. *et al.* Aplastic anemia rescued by exhaustion of cytokine-secreting CD8<sup>+</sup> T cells in persistent infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Exp Med* **187**, 1903-1920 (1998).

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* **12**, 64-76 (2000).

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **4**, 389-396 (1962).

BRIONES, M. R.; SOUTO, R. P.; STOLF, B. S. *et al.* The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol* **104**, 219-232 (1999).

BRISSE, S.; BARNABE, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* **30**, 35-44 (2000).

BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol* **31**, 1218-1226 (2001).

CALVANO, S. E.; XIAO, W.; RICHARDS, D. R. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* **437**, 1032-1037 (2005).

CAMPOS, M. A.; ALMEIDA, I. C.; TAKEUCHI, O. *et al.* Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* **167**, 416-423 (2001).

CAMPOS, M. A.; CLOSEL, M.; VALENTE, E. P. *et al.* Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J Immunol* **172**, 1711-1718 (2004).

CAMPOS, M. A. & GAZZINELLI, R. T. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators Inflamm* **13**, 139-143 (2004).

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J. C.; REED, S. G. *et al.* Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: Role of NK cells. *Infect Immun* **64**, 128-134 (1996).

CARRASCO, H. J.; VALENTE, S. A.; MILES, M. A. *Trypanosoma cruzi* strain-zymodeme and species-specific molecular marker generated in a single PCR reaction: significance for the study of the epidemiology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **92 suppl 1**, 197 (1997).

CASTAÑOS-VELEZ, E.; MAERLAN, S.; OSORIO, L. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Infection in Tumor Necrosis Factor Receptor p55-Deficient Mice. *Infect Immun* **66** (1998).

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **1**, 159-152 (1909).

CHANDRA, R. K. Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again. *Proc Nutr Soc* **58**, 681-683 (1999).

CHEN, L.; WATANABE, T.; WATANABE, H. *et al.* Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions. *Eur J Immunol* **31**, 265-275 (2001).

COOK, D. N. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* **59**, 61-66 (1996).

COSTA, G. C.; DA COSTA ROCHA, M. O.; MOREIRA, P. R. *et al.* Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis* **199**, 451-454 (2009).

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J Immunol* **180**, 5771-5777 (2008).

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **102 Suppl 1**, 113-122 (2007).

COURA, J. R. & DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104 Suppl 1**, 31-40 (2009).

COURA, J. R. & VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* **465**, Suppl. S6-S7 (2010).

COX, F. E. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology* **122**, Suppl. S23-38 (2001).

CREAGH, E. M. & O'NEILL, L. A. J. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *TRENDS in Immunology* **27**, 352-357 (2006).

DE LANA, M.; DA SILVEIRA PINTO, A.; BARNABE, C. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol* **90**, 20-25 (1998).

DE LANA, M.; DA SILVEIRA PINTO, A.; BASTRENTA, B. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: infectivity of clonal genotype infections in acute and chronic phases in mice. *Exp Parasitol* **96**, 61-66 (2000).

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **98**, 1-12 (2003).

DIAS, J. C. Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Cad Saude Publica* **16 Suppl 2**, 43-59 (2000).

DIAS, J. C. Globalization, inequity and Chagas diseases. *Cad Saude Publica* **23 Suppl 1**, S13-22 (2007).

DIAS, J. C.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **97**, 603-612 (2002).

DIAS, J. C. P. (1992). Epidemiology of Chagas' disease. Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M. E. *et al.* São Paulo, Brazil, ISBT: 49-80.

DONIZETTE-MALVEZI, A.; CECCHINI, R.; DE SOUZA, F. *et al.* Involvement of nitric oxide (NO) and TNF-alpha in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **41**, 69-77 (2004).

DULEU, S.; VINCENDEAU, P.; COURTOIS, P. *et al.* Mouse Strain Susceptibility to Trypanosome Infection: An Arginase-Dependent Effect. *J Immunol* **172**, 6298-6303 (2004).

DUTRA, W. O. & GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis* **21**, 287-292 (2008).

DUTRA, W. O.; MENEZES, C. A.; VILLANI, F. N. *et al.* Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104 Suppl 1**, 208-218 (2009).

EDELMAN, G. M. & GALLY, J. A. Degeneracy and complexity in biological systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13763–13768 (2001).

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* **309**, 409-415 (2005).

FERREIRA, M. S. Chagas disease and immunosuppression. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 325-327 (1999).

FOTEINOU, P. T.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. *et al.* Modeling endotoxin-induced systemic inflammation using an indirect response approach. *Mathematical Biosciences* **217**, 27-42 (2009).

FRANCO-PAREDES, C.; VON, A.; HIDRON, A. *et al.* Chagas disease: an impediment in achieving the Millennium Development Goals in Latin America. *BMC Int Health Hum Rights* **7**, 7 (2007).

FRANCO, D. J.; VAGO, A. R.; CHIARI, E. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. *Exp Parasitol* **104**, 54-61 (2003).

FREIRE-DE-LIMA, C. G.; NASCIMENTO, D. O.; SOARES, M. B. *et al.* Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* **403**, 199-203 (2000).

FREITAS, J. M.; ANDRADE, L. O.; PIRES, S. F. *et al.* The MHC gene region of murine hosts influences the differential tissue tropism of infecting *Trypanosoma cruzi* strains. *PLoS One* **4**, e5113 (2009).

FREITAS, J. M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J. R. *et al.* Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* **2**, e24 (2006).

FRITZ, J. H.; FERRERO, R. L.; PHILPOTT, D. J. *et al.* Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* **7**, 1250-1257 (2006).

GASQUE, P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol* **41**, 1089-1098 (2004).

GAZZINELLI, R. T. & DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol* **6**, 895-906 (2006).

GAZZINELLI, R. T.; ROPERT, C.; CAMPOS, M. A. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Rev* **201**, 9-25 (2004).

GOLGHER, D. & GAZZINELLI, R. T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity* **37**, 399-409 (2004).

GONI, O.; ALCAIDE, P.; FRESNO, M. Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr1<sup>(+)</sup>) CD11b<sup>(+)</sup> immature myeloid suppressor cells. *Int Immunol* **14**, 1125-1134 (2002).

GUTIERREZ, F. R.; MINEO, T. W.; PAVANELLI, W. R. *et al.* The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104 Suppl 1**, 236-245 (2009).

HEATH, W. R. & CARBONE, F. R. Immunology: dangerous liaisons. *Nature* **425**, 460-461 (2003).

HEINZEL, F. P.; RERKO, R. M.; HUJER, A. M. Underproduction of interleukin-12 in susceptible mice during progressive leishmaniasis is due to decreased CD40 activity. *Cell Immunol* **184**, 129–142 (1998).

HIGUCHI, M. L.; BENVENUTI, L. A.; MARTINS REIS, M. *et al.* Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res* **60**, 96-107 (2003).

HÖLSCHER, C.; KOHLER, G.; MULLER, U. *et al.* Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun* **66**, 1208-1215 (1998).

HÖLSCHER, C.; MOHRS, M.; DAI, W. J. *et al.* Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun* **68**, 4075-4083 (2000).

HOTCHKISS, R. S. & KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* **348**, 138-150 (2003).

HOTEZ, P.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A. *et al.* Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS Med* **3**, e102 (2006).

HUNTER, C. A.; SLIFER, T.; ARAUJO, F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Infect Immun* **64**, 2381-2386 (1996).

JANEWAY, C. A., JR. & MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**, 197-216 (2002).

JEAN-BAPTISTE, E. Cellular mechanisms in sepsis. *J Intensive Care Med* **22**, 63-72 (2007).

KAWAI, T. & AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* **21**, 317-337 (2009).

KEPLER, T. B. & CHAN, C. Spatiotemporal programming of a simple inflammatory process. *Immunol Rev* **216**, 153-163 (2007).

KIERSZENBAUM, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev* **12**, 210-223 (1999).

KIERSZENBAUM, F. Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **37**, 1-11 (2003).

KIERSZENBAUM, F. Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease. *Acta Parasitologica* **52**, 1-12 (2007).

KORBEL, D. S.; FINNEY, O. C.; RILEY, E. M. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *Int J Parasitol* **34**, 1517-1528 (2004).

KOTNER, J. & TARLETON, R. Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun* **75**, 861-869 (2007).

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **388**, 621-625 (2009).

LAGES-SILVA, E.; RAMIREZ, L. E.; PEDROSA, A. L. *et al.* Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J Clin Microbiol* **44**, 2167-2171 (2006).

MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; OLIVEIRA, R. P. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**, 1-12 (2004).

MACEDO, A. M. & PENA, S. D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol Today* **14**, 119-124 (1998).

MACEDO, A. M.; PIMENTA, J. R.; AGUIAR, R. S. *et al.* Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **96**, 407-413 (2001).

MACEDO, A. M.; VALLEJO, G. A.; CHIARI, E. *et al.* DNA fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *EXS* **67**, 321-329 (1993).

MAGUIRE, J. H. Chagas' disease - can we stop the deaths? *N Engl J Med* **355**, 760-761 (2006).

MANTILLA, J. C.; ZAFRA, G. A.; MACEDO, A. M. *et al.* Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. *Human Pathology* **41**, 610-613 (2010).

MARCONDES, M. C.; BORELLI, P.; YOSHIDA, N. *et al.* Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes Infect* **2**, 347-352 (2000).

MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C. *et al.* Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* **115**, 1109-1123 (2007).

MARTINS, H. R.; SILVA, R. M.; VALADARES, H. M. *et al.* Impact of dual infections on chemotherapeutic efficacy in BALB/c mice infected with major genotypes of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 3282-3289 (2007).

MARTINS, H. R.; TOLEDO, M. J.; VELOSO, V. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Impact of dual-clone infections on parasite biological properties in BALB/c mice. *Exp Parasitol* **112**, 237-246 (2006).

- MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**, 301-305 (2002a).
- MATZINGER, P. An innate sense of danger. *Ann N Y Acad Sci* **961**, 341-342 (2002b).
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428-435 (2008).
- MENEGHELLI, U. G. Chagasic enteropathy. *Rev Soc Bras Med Trop* **37**, 252-260 (2004).
- MICHAILOWSKY, V.; SILVA, N. M.; ROCHA, C. D. *et al.* Pivotal role of interleukin-12 and interferongamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* **159**, 1723-1733 (2001).
- MILES, M. A.; SOUZA, A.; POVOA, M. *et al.* Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* **272**, 819-821 (1978).
- MOLDAWER, L. L.; MARANO, M. A.; WEI, H. *et al.* Cachectin/tumor necrosis factor-alpha alters red blood cell kinetics and induces anemia in vivo. *FASEB J* **3**, 1637-1643 (1989).
- MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. P. *et al.* Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 6810-6814 (1980).

MOREL, C. & SIMPSON, L. Characterization of pathogenic *Trypanosomatidae* by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. *Am J Trop Med Hyg* **29**, 1070-1074 (1980).

MORROT, A.; STRICKLAND, D.; HIGUCHI, L. *et al.* Human T cell responses against the major cysteine proteinase (cruzipain) of *Trypanosoma cruzi*: role of the multifunctional alpha 2-macroglobulin receptor in antigen presentation by monocytes *Int Immunol* **9**, 825-834 (1997).

NOËL, W.; RAES, G.; GHASSABEH, G. H. *et al.* Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends Parasitol* **20**, 126-133 (2004).

OLIVEIRA, A. C.; PEIXOTO, J. R.; DE ARRUDA, L. B. *et al.* Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol* **173**, 5688-5696 (2004).

OLIVEIRA, R. P.; BROUDE, N. E.; MACEDO, A. M. *et al.* Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3776-3780 (1998).

PAIVA, C. N.; FIGUEIREDO, R. T.; KROLL-PALHARES, K. *et al.* CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Leukoc Biol* **86**, 1239-1246 (2009).

PENA, S. D.; MACHADO, C. R.; MACEDO, A. M. *Trypanosoma cruzi*: ancestral genomes and population structure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104 Suppl 1**, 108-114 (2009).

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* **1**, 92-100 (2001).

PUNUKOLLU, G.; GOWDA, R. M.; KHAN, I. A. *et al.* Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol* **115**, 279-283 (2007).

RAES, G.; BESCHIN, A.; GHASSABEH, G. H. *et al.* Alternatively activated macrophages in protozoan infections. *Curr Opin Immunol* **19**, 454-459 (2007).

RAMASAWMY, R.; CUNHA-NETO, E.; FAE, K. C. *et al.* BAT1, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. *J Infect Dis* **193**, 1394-1399 (2006).

RAMASAWMY, R.; FAE, K. C.; CUNHA-NETO, E. *et al.* Variants in the promoter region of IKBL/NFKBIL1 gene may mark susceptibility to the development of chronic Chagas' cardiomyopathy among *Trypanosoma cruzi*-infected individuals. *Mol Immunol* **45**, 283-288 (2008).

RAMASAWMY, R.; FAE, K. C.; CUNHA-NETO, E. *et al.* Polymorphisms in the gene for lymphotoxin-alpha predispose to chronic Chagas cardiomyopathy. *J Infect Dis* **196**, 1836-1843 (2007).

REIS, D. D.; JONES, E. M.; TOSTES, S., JR. *et al.* Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg* **48**, 637-644 (1993).

RIBEIRO-GOMES, F. L.; OTERO, A. C.; GOMES, N. A. *et al.* Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol* **172**, 4454-4462 (2004).

RIBEIRO, D. A.; CALVI, S. A.; PICKA, M. M. *et al.* DNA damage and nitric oxide synthesis in experimentally infected Balb/c mice with *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* **116**, 296-301 (2007).

ROCHA, M. O.; RIBEIRO, A. L.; TEIXEIRA, M. M. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front Biosci* **8**, 44-54 (2003).

ROGGERO, E.; PEREZ, A.; TAMAE-KAKAZU, M. *et al.* Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. *Clin Exp Immunol* **128**, 421-428 (2002).

ROQUE, S.; NOBREGA, C.; APPELBERG, R. *et al.* IL-10 underlies distinct susceptibility of BALB/c and C57BL/6 mice to *Mycobacterium avium* infection and influences efficacy of antibiotic therapy. *J Immunol* **178**, 8028-8035 (2007).

ROTTENBERG, M. E.; BAKHIET, M.; OLSSON, T. *et al.* Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun* **61**, 5129-5133 (1993).

SACKS, D. & NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* **11**, 845-858 (2002).

SACKS, D. & SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* **3**, 1041-1047 (2002).

SAEFTEL, M.; FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* **69**, 2252-2259 (2001).

SALES, P. A., JR.; GOLGHER, D.; OLIVEIRA, R. V. *et al.* The regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect* **10**, 680-688 (2008).

SANTOS, C. D.; CALDEIRA, J. C.; TOLDO, M. P. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: effects of repetitive stress during the development of experimental infection. *Exp Parasitol* **110**, 96-101 (2005).

SANTOS, C. D.; TOLDO, M. P.; LEVY, A. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: effects of social stress in *Calomys callosus* a natural reservoir of infection. *Exp Parasitol* **119**, 197-201 (2008).

SANTOS, F. R.; PENA, S. D. J.; EPPLEN, J. T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Mol Genet* **90**, 655-656 (1993).

SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. *et al.* Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104 Suppl 1**, 246-251 (2009).

SAVINO, W.; VILLA-VERDE, D. M.; MENDES-DA-CRUZ, D. A. *et al.* Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine Growth Factor Rev* **18**, 107-124 (2007).

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **102 Suppl 1**, 75-85 (2007).

SCHMUNIS, G. A. & YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* (2009).

SOEIRO, N.; PAIVA, M. M.; WAGHABI, M. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: acute infection affects expression of alpha-2-macroglobulin and A2MR/LRP receptor differently in C3H and C57BL/6 mice. *Exp Parasitol* **96**, 97-107 (2000).

SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M. *et al.* DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **83**, 141-152 (1996).

SOUTO, R. P. & ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol* **62**, 45-52 (1993).

STEINDEL, M.; KRAMER PACHECO, L.; SCHOLL, D. *et al.* Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* **60**, 25-32 (2008).

TALVANI, A.; ROCHA, M. O.; BARCELOS, L. S. *et al.* Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis* **38**, 943-950 (2004).

TARLETON, R. L. Depletion of CD8<sup>+</sup> T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* **144**, 717-724 (1990).

TARLETON, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol* **19**, 430-434 (2007).

TARLETON, R. L.; GRUSBY, M. J.; POSTAN, M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol* **8**, 13-22 (1996).

TARLETON, R. L.; REITHINGER, R.; URBINA, J. A. *et al.* The challenges of Chagas Disease - grim outlook or glimmer of hope. *PLoS Med* **4**, e332 (2007).

TARLETON, R. L.; ZHANG, L.; DOWNS, M. O. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3932-3937 (1997).

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol* **18**, 262-265 (2002).

TIBAYRENC, M. & AYALA, F. J. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomic and epidemiological significance. *Evolution* **42**, 277-292 (1988).

TIBAYRENC, M.; BRENIERE, F.; BARNABE, C. *et al.* Isozymic variability of *Trypanosoma cruzi*: biological and epidemiological significance. *Ann Soc Belg Med Trop* **65 Suppl 1**, 59-61 (1985).

TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A. *et al.* Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 115-119 (1986).

TRINCHIERI, G. & SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* **7**, 179-190 (2007).

TRUYENS, C.; TORRICO, F.; ANGELO-BARRIOS, A. *et al.* The cachexia associated with *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice is attenuated by anti-TNF-alpha, but not by anti-IL-6 or anti-IFN-gamma antibodies. *Parasite Immunol* **17**, 561-568 (1995).

TRUYENS, C.; TORRICO, F.; LUCAS, R. *et al.* The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **67**, 5579-5586 (1999).

VAGO, A. R.; ANDRADE, L. O.; LEITE, A. A. *et al.* Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol* **156**, 1805-1809 (2000).

VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J. *et al.* PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet* **348**, 891-892 (1996a).

VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P. *et al.* Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol* **149**, 2153-2159 (1996b).

VALADARES, H. M.; PIMENTA, J. R.; DE FREITAS, J. M. *et al.* Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *Int J Parasitol* **38**, 839-850 (2008).

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

WEBSTER, N. R. & GALLEY, H. F. Immunomodulation in the critically ill. *Br J Anaesth* **103**, 70-81 (2009).

WHO. Global Plan to Combat Neglected Diseases 2008-2015. *WHO, Geneva, Switzerland, WHO/CDS/NTD/2007* (2007).

WRIGHTSMAN, R.; KRASSNER, S.; WATSON, J. Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. *Infect Immun* **36**, 637-644 (1982).

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**, 1051-1054 (2009).

ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H. *et al.* Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol* **28**, 105-112 (1998).

ZINGALES, B.; STOLF, B. S.; SOUTO, R. P. *et al.* Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 159-164 (1999).