



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas



Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Tripanossomatídeos (LATRI)

**EFEITO DO TRATAMENTO COM IL-3, IL-7 OU IL-9 EM  
CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM  
*Trypanosoma cruzi***

Rosiane Nascimento Alves

Uberlândia

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas



Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Tripanossomatídeos (LATRI)

**EFEITO DO TRATAMENTO COM IL-3, IL-7 OU IL-9 EM  
CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM  
*Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Rosiane Nascimento Alves

Orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Uberlândia

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

A474e  
2015

Alves, Rosiane Nascimento, 1985-  
Efeito do tratamento com IL-3, IL-7 OU IL-9 em camundongos  
experimentalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* / Rosiane  
Nascimento Alves. - 2015.  
96 f. : il.

Orientador: Claudio Vieira da Silva.

Coorientador: Marcelo Emílio Beletti.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 3. Chagas,  
Doença de - Teses. 4. Interleucina-3 - Teses. I. Silva, Claudio Vieira da.  
II. Beletti, Marcelo Emílio. III. Universidade Federal de Uberlândia.  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
IV. Título.

---

CDU: 612.017

## **DEDICATÓRIA**

*À Deus,*

*por estar sempre ao meu lado me dando forças para superar meus medos e fraquezas. Sei que nunca estou sozinha, pois tenho o Senhor dentro de mim!*

*Aos meus pais,*

*Edivon e Nalba, meus exemplos de vida e perseverança, por sempre me apoiarem e incentivarem. Tudo o que sou hoje devo ao esforço incansável de vocês. Serei eternamente grata ao amor incondicional e a todas as concessões que fizeram para que eu chegasse até aqui. Vocês são os amores da minha vida!*

*À minha irmã,*

*Daiane, minha melhor amiga e conselheira, por todos os conselhos e desabafos. Sua presença é fundamental na minha vida.*

*Ao meu eterno amor,*

*Arlindo Neto, pelo apoio durante todos estes anos. Pela presença e companheirismo, mesmo não compreendendo meu mundo científico.*

*Vocês são o que tenho de mais valioso!*

*“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.*

*Albert Einstein*

## ***AGRADECIMENTOS***

*Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador Dr. Claudio Vieira da Silva pela confiança e oportunidade. Por estar sempre disponível, me auxiliando no que precisei. Obrigada por mais esta lição de entusiasmo e de como devemos agir no meio acadêmico e de pesquisa, apesar dos inúmeros obstáculos.*

*Agradeço ao meu co-orientador Dr. Marcelo Emílio Beletti, por todo exemplo e motivação. Apesar do nosso curto tempo de convivência nestes últimos anos, todos os momentos foram de extrema importância.*

*As minhas grandes e verdadeiras amigas, Nayhanne, Loyane, Nágilla, Bellisa e Ester por compartilharem comigo frustrações, angústias e alegrias tornando os meus dias melhores. Vocês são flores lindas que perfumam meu jardim!*

*A todos os amigos e companheiros de trabalho que conquistei no LATRI, em especial a Adele, Aninha, Flávia, Aline, Amanda e Brunessa pela ajuda incondicional. Por todas as parasitemias intermináveis e ao mesmo tempo tão divertidas!*

*A todos os amigos do laboratório de Histologia, pelo ótimo convívio e pelos momentos de descontração de todos os dias. Em especial ao meu querido amigo Paulo Victor que mesmo distante me*

*ajudou nas estatísticas e em tudo que precisei. Amigo, você faz uma imensa falta!*

*À todos os funcionários do CBEA, em especial ao técnico Junão, pela grande ajuda na manipulação dos animais e durante os sacrifícios.*

*As secretárias do programa de pós-graduação, Lucélia e Lucileide, por estarem sempre dispostas a me ajudar, esclarecendo minhas dúvidas e indicando o melhor a fazer.*

*À todos os funcionários e professores que permitiram a minha utilização dos seus laboratórios em diferentes etapas do estudo.*

*As agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro, indispensável à execução deste trabalho.*

## LISTA DE ABREVIATURAS

- APCs – Células apresentadoras de抗ígenos  
CBA – *Cytometric Bead Assay*  
CBEA – Centro de Bioterismo e Experimentação Animal  
CCC – Cardiomiosite chagásica crônica  
CEUA – Comitê de Ética na Utilização de Animais  
CD4 – *Cluster of differentiation 4*  
CD8 – *Cluster of differentiation 8*  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono  
d.p.i. – dia pós-infecção  
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*  
EAE – Encefalomielite Alérgica Experimental  
EROs – Espécies reativas de oxigênio  
GATA3 - *GATA Binding Protein 3*  
H&E – Hematoxilina e eosina  
HEPES – *N*-(2-hidroxietil) piperazina-*N'*-(2-ácido etanosulfônico)  
IFN-γ – Interferon-γ  
IL-1β – Interleucina-1β  
IL-2 – Interleucina-2  
IL-2Rα – porção α do receptor de IL-2  
IL-3 – Interleucina-3  
IL-4 – Interleucina-4  
IL-5 – Interleucina-5  
IL-6 – Interleucina-6  
IL-7 – Interleucina-7  
IL-7Rα – porção α do receptor de IL-7  
IL-9 – Interleucina-9  
IL-10 – Interleucina-10  
IL-12 – Interleucina-12  
IL-13 – Interleucina-13  
IL-15 – Interleucina-15  
IL-15Rβ – porção β do receptor de IL-15  
IL-17 – Interleucina-17

IL-18 – interleucina-18

KS – Kolmogorov-Smirnov

NK – *Natural Killer*

NO – Óxido nítrico

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

SCF – *Stem Cell Factor*

STAT5 – *Signal Transducer and Activator of Transcription 5*

STAT6 – *Signal Transducer and Activator of Transcription 6*

TCT – Tripomastigotas de cultura de tecido

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

Th1 – T *helper 1*

Th2 – T *helper 2*

Th17 – T *helper 17*

TLRs – Receptores *Toll-like*

TLR2 – Receptor *Toll-like 2*

TLR9 – Receptor *Toll-like 9*

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

Treg – T regulatórias

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

v/v – volume/volume

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 2. O tratamento com IL-3, IL-7 ou IL-9 não alterou os parâmetros clínicos dos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 3. O tratamento dos animais infectados com IL-3 reduziu a inflamação induzida por <i>T. cruzi</i> no coração .....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 4. O tratamento com IL-9 diminuiu a fibrose cardíaca nos animais infectados com <i>T. cruzi</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 5. O tratamento com IL-3, IL-7 ou IL-9 não alterou a quantidade de mastócitos no coração dos animais infectados com <i>T. cruzi</i> .....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 6. O tratamento com IL-3, IL-7 ou IL-9 alterou o perfil das citocinas nos animais infectados com <i>T. cruzi</i> .....</b>	<b>57</b>

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1. Doença de Chagas .....	15
1.1.1. Fase aguda .....	19
1.1.2. Fase crônica .....	20
1.2. Ciclo biológico e <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	21
1.3. Resposta imunológica contra <i>T. cruzi</i> .....	25
1.3.1. IL-3, IL-7 e IL-9 na resposta imunológica contra <i>T. cruzi</i> .....	33
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
2.1. Objetivo geral .....	36
2.2. Objetivos específicos .....	36
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
3.1. Animais .....	37
3.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	37
3.3. Delineamento experimental .....	38
3.4. Análises histopatológicas .....	39
3.4.1. Quantificação do infiltrado inflamatório .....	39
3.4.2. Quantificação da fibrose cardíaca .....	40
3.5. Quantificação de mastócitos cardíacos .....	40
3.6. Dosagem sérica de citocinas .....	41
3.7. Análise estatística .....	41
3.8. Normas de biossegurança .....	42
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>

4.1. Todos os tratamentos diminuíram o ganho de peso dos animais não infectados com <i>T. cruzi</i> , porém não houve alteração na morbidade .....	42
4.2. Todos os animais infectados com <i>T. cruzi</i> apresentaram parasitemia média positiva aos 10 d.p.i. embora a taxa de sobrevivência não tenha sido alterada .....	43
4.3. O tratamento dos animais infectados com IL-3 reduziu a inflamação induzida por <i>T. cruzi</i> no coração .....	46
4.4. O tratamento com IL-9 diminuiu a fibrose cardíaca nos animais infectados com <i>T. cruzi</i> .....	49
4.5. Os tratamentos não alteraram a quantidade de mastócitos no coração dos animais infectados com <i>T. cruzi</i> ...	52
4.6. Os tratamentos alteraram o perfil das citocinas nos animais infectados com <i>T. cruzi</i> .....	55
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>68</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>96</b>

## RESUMO

A Doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é classificada como a doença parasitária mais grave da América Latina e tornou-se um problema mundial. A maior parte dos estudos confirma que as citocinas de perfil Th1 são elementos essenciais na resistência precoce contra o parasita e estão associadas ao desenvolvimento da forma cardíaca crônica. Embora as citocinas tenham um papel chave na resposta imune contra *T. cruzi*, pouco se sabe a respeito da função de IL-3, IL-7 e IL-9 neste contexto. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar o papel destas citocinas na fase aguda da infecção experimental com *T. cruzi*. Para isto, parâmetros indicativos de melhora clínica dos animais tanto infectados e tratados como apenas tratados foram estudados, tais como: morbidade, mortalidade e histopatologia. A quantidade de mastócitos cardíacos e o perfil de citocinas séricas também foram avaliados. Os dados revelaram que o tratamento com IL-3, IL-7 ou IL-9 não alterou os parâmetros clínicos analisados nem a quantidade de mastócitos cardíacos nos camundongos infectados com *T. cruzi*. No entanto, o tratamento com IL-3 diminuiu a inflamação cardíaca *T. cruzi*-induzida e o tratamento com IL-7 aumentou os níveis séricos de IL-5 nos animais infectados. Além disso, o tratamento com IL-9 aumentou os níveis séricos das citocinas de perfil Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e diminuiu a fibrose cardíaca nos animais infectados, sugerindo um possível papel protetor desta citocina neste contexto. Em suma, os nossos resultados demonstram a importância destas citocinas na modulação da infecção

por *T. cruzi*. Já que estudos envolvendo a atividade de IL-3, IL-7 e IL-9 durante a doença de Chagas são fundamentais na compreensão sobre o processo de controle parasitário e da ação protetora e/ou prejudicial dessas citocinas no hospedeiro. Além disso, o entendimento dos mecanismos imunológicos mediados por estas citocinas que estão envolvidos no desenvolvimento da doença pode contribuir para o estabelecimento de novas intervenções terapêuticas a fim de prevenir a doença de Chagas e tratar suas formas sintomáticas.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*; interleucina-3 (IL-3); interleucina-7 (IL-7); interleucina-9 (IL-9).

## ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is ranked as the most serious parasitic disease in Latin America and has become a worldwide problem. A bulk of studies substantiates that Th1-associated cytokines are essential elements in early resistance against the parasite and are associated with the development of the chronic cardiac form. Although cytokines have a key role in the immune response against *T. cruzi*, little is known about IL-3, IL-7 and IL-9 in this context. Then the aim of this study was to analyze the role of IL-3, IL-7 and IL-9 in the acute phase of *T. cruzi* experimental infection. For this purpose, parameters indicative of improvement in clinical status of the animals both infected and treated as just treated were studied, such as: morbidity, mortality and histopathology. The amount of cardiac mast cells and the serum cytokines profile were also evaluated. Our data revealed that the treatment with IL-3, IL-7 or IL-9 did not alter the clinical parameters analyzed or the amount of cardiac mast cells in mice infected with *T. cruzi*. However the treatment with IL-3 decreased the cardiac *T. cruzi*-induced inflammation and the treatment with IL-7 increased serum levels of IL-5 in infected animals. In addition, the treatment with IL-9 increased the serum levels of Th1 cytokine profile (IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) and decreased cardiac fibrosis in infected animals, suggesting a possible protective role of this cytokine in this context. Taken together, our results underline the importance of these cytokines in modulation of *T. cruzi* infection. Since studies involving IL-3, IL-7 and IL-9 activity during Chagas disease are critical in

understanding the parasite control process and the protective and/or harmful action of these cytokines in the host. In addition, understanding of the immunological mechanisms mediated by these cytokines that are involved in disease development may contribute to the establishment of new therapeutic interventions to prevent Chagas disease and treat their symptomatic forms.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*; interleukin-3 (IL-3); interleukin-7 (IL-7); interleukin-9 (IL-9).

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, é uma antropozoonose potencialmente fatal causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Conforme dados da Organização Mundial da Saúde cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo parasita, principalmente na América Latina onde a doença é endêmica (WHO, 2015). Nas últimas décadas, a doença tem sido cada vez mais detectada nos Estados Unidos da América, Canadá, muitos países europeus (ex.: Espanha, Itália, Reino Unido, Holanda e Suíça) e em alguns países do Pacífico ocidental (ex.: Austrália e Japão), devido à contínua migração da população entre a América Latina e o restante do mundo além do turismo internacional (COURA; VIÑAS, 2010; HABERLAND *et al.*, 2013; WHO, 2015). No Brasil, estima-se que 2 a 3 milhões de pessoas estejam infectadas e que ocorra 6.000 mortes decorrentes da doença anualmente (MARTINS-MELO *et al.*, 2014).

A doença de Chagas é composta por duas fases consecutivas, a fase aguda e a crônica. Logo após a infecção, inicia-se a fase aguda da doença que pode durar semanas ou meses. Na ausência de tratamento, o hospedeiro entra na fase crônica que persiste indefinidamente e apresenta sintomatologia clínica variável (HABERLAND *et al.*, 2013). Vários estudos demonstram que essas diferenças clínicas estão relacionadas à resposta imune do hospedeiro bem como à

patogenicidade do *T. cruzi*, uma vez que tal espécie é heterogênea, composta por várias subpopulações que circulam entre vertebrados domésticos e selvagens (ARCE-FONSECA *et al.*, 2005; MANOEL-CAETANO; SILVA, 2007). Além disso, diferentes cepas de *T. cruzi* possuem tropismos distintos para diferentes órgãos do hospedeiro (VIANNA, 1911; ANDRADE *et al.*, 1999). Assim, fatores, tais como, tempo de infecção, características imune e genética do hospedeiro bem como a cepa, inóculo e tropismo parasitários, influenciam diretamente a progressão clínica da doença de Chagas (DUTRA;GOLLOB, 2008).

A principal forma de transmissão da doença ocorre através do contato com as fezes/ urina do inseto vetor infectado. Estes vetores são triatomíneos que habitam rachaduras de casas mal construídas em áreas rurais ou suburbanas e possuem hábito noturno realizando o repasto sanguíneo durante a noite. Ao picarem o hospedeiro vertebrado, defecam próximo à picada e liberam os parasitas que entram no corpo deste hospedeiro quando instinctivamente o mesmo espalha as fezes do triatomíneo na picada, olhos, boca, ou em qualquer ruptura da pele (WHO, 2015). Além da transmissão vetorial, a doença de Chagas pode ser transmitida por meio de transfusão sanguínea, transmissão congênita, acidentes laboratoriais, transplante de órgãos e por via oral (COURA, 2013; WHO, 2015). No Brasil, relatos recentes de surtos de contaminação oral pela ingestão de alimentos contaminados, tais como, açaí in natura ou caldo de cana-de-açúcar têm sido frequentemente notificados (STEINDEL *et al.*, 2008; MARTINS-MELO *et al.*, 2014).

Atualmente, o tratamento da doença de Chagas é baseado na utilização de dois agentes terapêuticos, o Benznidazol e o Nifurtimox, eficazes apenas se empregados durante a fase aguda da doença para a eliminação do parasita (APT, 2010). Sem eles, a persistência parasitária ao longo da vida é mantida e a doença progride para a fase crônica, estágio no qual a grande maioria dos pacientes é diagnosticada e os tratamentos não são eficazes (HABERLAND *et al.*, 2013; CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014). O tratamento também é indicado para aqueles em que a infecção foi reativada (ex.: imunossuprimidos), para crianças com infecção congênita e para os pacientes durante a fase crônica precoce. Adultos infectados, especialmente aqueles assintomáticos, devem ser tratados já que o tratamento anti-parasitário pode prevenir ou parar a progressão da doença (WHO, 2015). Porém, algumas cepas de *T. cruzi* podem desenvolver resistência contra estas drogas, sendo apenas 50% dos pacientes tratados responsivos ao tratamento. Além disso, as drogas existentes apresentam alta toxicidade, manifestada no fígado e como reações alérgicas, principalmente após administração a longo prazo (APT, 2010; HABERLAND *et al.*, 2013). Assim, os benefícios potenciais da medicação em prevenir ou retardar o desenvolvimento da doença de Chagas devem ser avaliados em relação a longa duração do tratamento (30 – 60 dias) e as possíveis reações adversas, que ocorrem em até 40% dos pacientes tratados. Estes fármacos são contra-indicados para mulheres gestantes e para pessoas com insuficiência renal ou hepática (HABERLAND *et al.*, 2013). Há décadas não são produzidos novos

fármacos que apresentem maior eficácia e menores efeitos colaterais, embora vários estudos estejam sendo realizados com este intuito (APT, 2010; BUCKNER; NAVABI, 2010).

Durante milhões de anos, *T. cruzi* infectava exclusivamente animais selvagens e a doença de Chagas era considerada uma enzooose, passando a ser zoonose anos depois ao infectar animais domésticos e humanos. O grande reservatório do parasita nos animais selvagens das Américas, composto por mais de 100 espécies de mamíferos principalmente silvestres, indica sua improvável erradicação (COURA; VIÑAS, 2010; ESCH; PETERSEN, 2013). Assim, as metas para o controle da doença baseiam-se na eliminação da transmissão e no tratamento adequado da população infectada (WHO, 2015). Além disso, até o momento não existe vacina para a doença de Chagas e o método mais eficaz de prevenção ainda é o controle vetorial, embora a triagem dos bancos de sangue tenha reduzido substancialmente a transmissão de *T. cruzi* por transfusão sanguínea e transplante de órgãos (ESCH; PETERSEN, 2013; WHO, 2015). No Brasil, a transmissão de *T. cruzi* pelo *Triatoma infestans*, um dos principais vetores, e por transfusão sanguínea estão sob controle, mas os estados do Rio Grande do Sul e da Bahia possuem focos residuais deste vetor. Portanto, ainda existe o risco de re-introdução deste triatomíneo no país (COURA, 2013).

Considerando a migração mundial, o turismo internacional, a grande variedade de reservatórios e de vetores competentes, e a natureza muitas vezes assintomática da infecção, a doença de Chagas

continuará sendo um desafio na saúde pública mundial por tempo indeterminado.

### **1.1.1. Fase aguda**

A fase aguda da doença de Chagas comprehende os primeiros meses de infecção e é caracterizada pelo alto número de parasitas circulantes no sangue. Embora ocorra alta parasitemia com duração de 40 a 60 dias, a sintomatologia pode estar ausente ou suave e inespecífica, sendo frequentemente confundida com outras infecções. Assim, normalmente a doença de Chagas não é reconhecida neste estágio da doença (BASTOS *et al.*, 2010). Menos de 50% das pessoas picadas pelo vetor, podem apresentar sintomas iniciais característicos, tais como, lesão de pele, inchaço arroxeados de pálpebra unilocular, febre, dor de cabeça, aumento dos gânglios linfáticos, palidez, dor muscular, dificuldade em respirar, inchaço e dor abdominal ou torácica (WHO, 2015). Hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite são vistas ocasionalmente, em um pequeno número de pacientes, especialmente em crianças (HABERLAND *et al.*, 2013).

Esta fase apresenta baixa taxa de mortalidade de 2 – 6%, observada principalmente em crianças e indivíduos imunossuprimidos que adquirem a infecção por transfusão sanguínea ou transplante de órgãos. As principais causas de óbito estão relacionadas à miocardite acompanhada de insuficiência cardíaca refratária e meningoencefalite (TEIXEIRA *et al.*, 2006; HABERLAND *et al.*, 2013).

### 1.1.2. Fase crônica

Posteriormente a fase aguda, inicia-se a fase crônica da doença, caracterizada por parasitemia ausente ou baixa, uma vez que os parasitas possuem tropismo tecidual e concentram-se principalmente no músculos, cardíaco e esquelético, e nas células neuronais (HABERLAND *et al.*, 2013). Porém, o paciente apresenta sorologia positiva em diferentes exames laboratoriais de rotina. Além disso, essa fase possui as seguintes formas clínicas: indeterminada/ assintomática e sintomática (cardíaca ou digestiva) (HABERLAND *et al.*, 2013).

Entende-se por forma indeterminada, a presença de infecção chagásica na ausência de manifestações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas de acometimento cardíaco ou digestivo (SATHLER-AVELAR *et al.*, 2009). Esta é a fase mais comum da doença de Chagas acometendo 70% dos cronicamente infectados e é de grande interesse médico-epidemiológico, uma vez que os pacientes apesar de serem assintomáticos podem evoluir para a forma sintomática além de permanecerem como importantes reservatórios do parasita (HABERLAND *et al.*, 2013).

Cerca de 30% dos pacientes cronicamente infectados tornam-se sintomáticos após 10 a 30 anos de infecção latente, apresentando formas clínicas progressivas e sem tratamento (CLAY *et al.*, 2014). Destes, 90% desenvolvem distúrbios cardíacos associados a arritmias e falhas cardíacas. Estudos recentes têm identificado genes relacionados à susceptibilidade em desenvolver o pior quadro clínico da doença, a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) em humanos

(CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014). Já o restante dos pacientes cronicamente infectados, manifesta a doença gastrointestinal, principalmente megacôlon e megaesôfago, e/ou alterações no sistema nervoso. Alguns pacientes podem apresentar mais de uma complicações (COURA; VIÑAS, 2010; HABERLAND *et al.*, 2013).

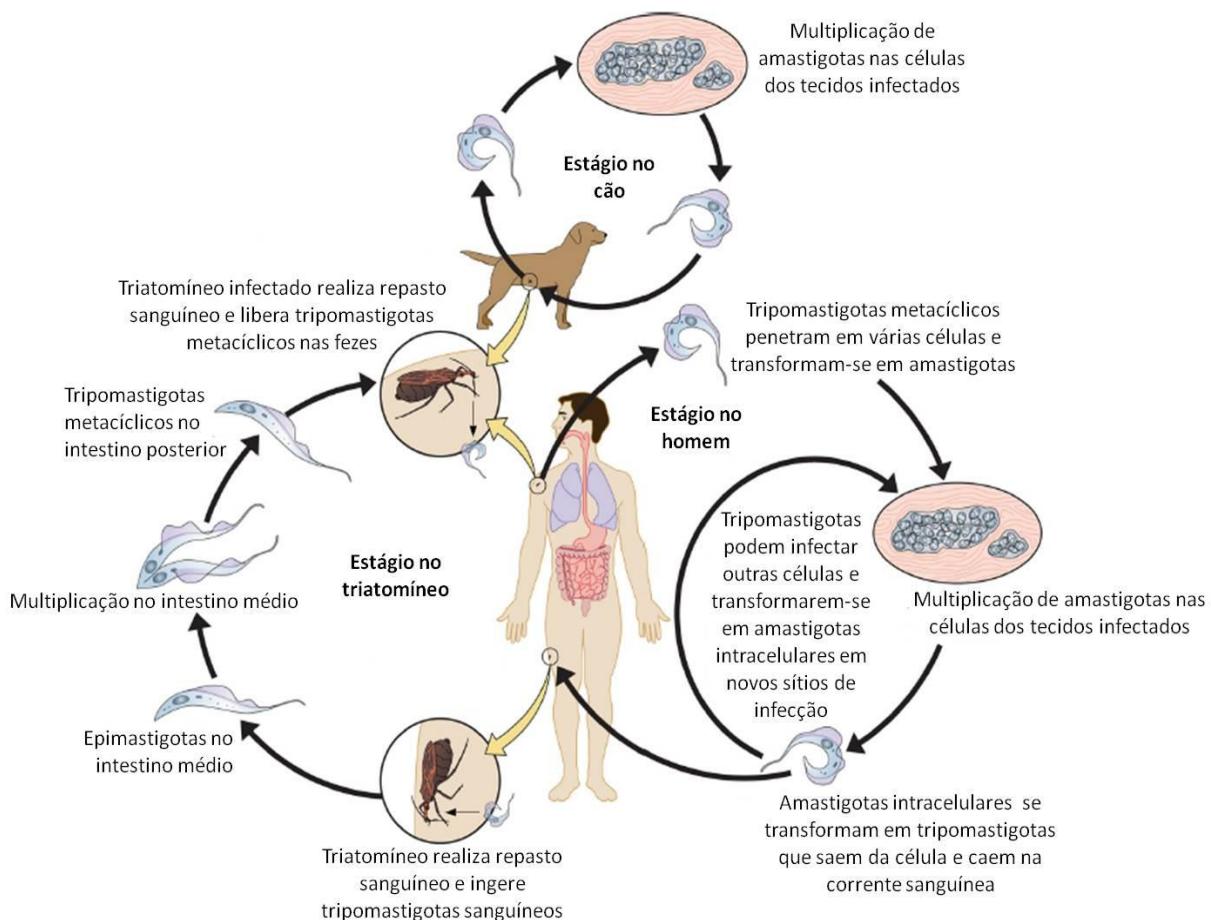
A prevalência das formas clínicas crônicas bem como a morbidade da doença de Chagas estão correlacionadas à área geográfica. A doença é mais severa em Minas Gerais e no Piauí, e moderada na Paraíba, Mato Grosso do Sul e região Amazônica (COURA, VIÑAS, 2010). Estas diferenças podem estar relacionadas tanto aos aspectos genéticos e imunológicos da população humana local, quanto ao inóculo e polimorfismos genéticos de *T. cruzi* (COURA *et al.*, 2002; ZINGALES *et al.*, 2009).

## **1.2. Ciclo biológico e *Trypanosoma cruzi***

*Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado, agente etiológico da doença de Chagas, pertencente à Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae, que caracteriza-se morfologicamente por apresentar três estágios evolutivos distintos: epimastigota, tripomastigota e amastigota (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984).

O ciclo biológico de *T. cruzi* é heteroxênico, envolvendo hospedeiro vertebrado (mamíferos de várias espécies, inclusive o homem) e invertebrado (vetor) (Figura 01). Os vetores são insetos hemípteros da Família Reduviidae, cujos gêneros de maior importância são *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, embora outros 12 gêneros

têm transmitido a doença entre os animais por quase 10 milhões de anos (COURA; VIÑAS, 2010). O ciclo se inicia quando o vetor ingere formas tripomastigotas sanguíneos de um hospedeiro vertebrado infectado com *T. cruzi* durante o repasto sanguíneo. Estes parasitas passam então para o intestino médio do vetor onde se multiplicam como epimastigotas e posteriormente migram para o intestino posterior, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos altamente infectantes que saem pelas fezes. Ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, esses vetores defecam e depositam suas fezes contendo parasitas sobre a pele ou mucosas do hospedeiro. A penetração do parasita no hospedeiro vertebrado pode ocorrer diretamente através das mucosas ou por meio de uma lesão tecidual proveniente do ato de coçar o local da picada. A partir daí, os tripomastigotas metacíclicos invadem diferentes tipos celulares, onde se diferenciam em amastigotas capazes de se multiplicar após 20 a 30 horas. Amastigotas replicam durante 5 a 6 dias até consumirem alta porcentagem do compartimento citoplasmático da célula hospedeira antes da diferenciação em tripomastigotas, resultando em ruptura da membrana plasmática e disseminação para o espaço intercelular e circulação sanguínea. Esses tripomastigotas, chamados tripomastigotas sanguíneos, são capazes de invadir macrófagos e outras células de diferentes tecidos e órgãos do hospedeiro, disseminando assim a infecção intracorporal ou podem ser ingeridos por outro vetor durante novo repasto sanguíneo, iniciando um novo ciclo (VIANNA, 1911).



**Figura 1. Ciclo biológico de *T. cruzi*.** Um vetor triatomíneo infectado realiza repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero, liberando triomastigotas metacíclicos infectantes nas fezes, próximo ao local da picada ou às mucosas. Estes parasitas penetram no hospedeiro mamífero, invadem diferentes células onde se diferenciam em amastigotas e iniciam a replicação. Posteriormente, os amastigotas intracelulares escapam do citoplasma da célula hospedeira, diferenciam-se em triomastigotas sanguíneos e são liberados na corrente sanguínea. Insetos triatomíneos se infectam através da ingestão de triomastigotas sanguíneos circulantes de mamíferos infectados, que se transformam em epimastigotas dentro do intestino médio do vetor e finalizam a diferenciação em triomastigotas metacíclicos no intestino posterior. Adaptado de (ESCH; PETERSEN, 2013).

Recentemente, um ciclo alternativo foi sugerido envolvendo formas amastigotas provenientes ou da diferenciação extracelular de triponastigotas sanguíneos, designadas amastigotas extracelulares (LEY *et al.*, 1988; MORTARA, 1991) ou da lise precoce das células infectadas, denominadas amastigotas intracelulares (UMEZAWA *et al.*, 1985), no hospedeiro vertebrado. Estas amastigotas são capazes de invadir células fagocíticas e não fagocíticas neste hospedeiro e dar continuidade ao ciclo biológico (UMEZAWA *et al.*, 1985; LEY *et al.*, 1988).

Diferenças na distribuição geográfica dos hospedeiros vertebrados e dos vetores associada às preferências alimentares do vetor, definem três diferentes ciclos de transmissão do *T. cruzi*: o ciclo silvestre, o peridoméstico e o doméstico (COURA, 2013). No ciclo silvestre, há um balanço ecológico entre o parasita, seus vetores e hospedeiros vertebrados, já nos ciclos peridoméstico e doméstico o contato entre homem e vetor, provém do desequilíbrio ecológico gerado pelas alterações ecológicas e sociais provocadas pelo homem no ambiente (DIAS, 1987). Assim, com o desmatamento e a introdução de animais domésticos no ambiente silvestre, bem como a invasão dos vetores e hospedeiros silvestres no ambiente doméstico/ peridoméstico, milhões de pessoas têm sido infectadas (COURA, 2013; ESCH; PETERSEN, 2013).

Recentemente, Zingales e colaboradores (2009) dividiram as cepas de *T. cruzi* em seis *discrete typing units* (DTUs), *T. cruzi* I a VI, conforme seu conteúdo genético. A distribuição geográfica indica que

*T. cruzi* II e VI são os principais agentes causadores da doença de Chagas no sudeste da América do Sul (FERNANDES *et al.*, 1999; ZINGALES *et al.*, 2009). Já *T. cruzi* I foi descrito como principal agente causador da doença em humanos na Colômbia, Venezuela e América Central (AÑEZ *et al.*, 2004; BLACK *et al.*, 2007; ESPINOZA *et al.*, 2009; MEJÍA-JARAMILLO *et al.*, 2009).

### **1.3. Resposta imunológica contra *T. cruzi***

A resposta imune contra *T. cruzi* é uma complexa rede de interação constituída pela imunidade inata e adaptativa, onde a supressão de qualquer aspecto pertencente a cada uma pode resultar na sobrevivência do parasita e consequente doença crônica (ESCH; PETERSON, 2013). A infecção por *T. cruzi* induz uma forte resposta imune tanto humoral quanto celular necessárias ao controle da infecção, assim, o resultado da interação hospedeiro-parasita nas fases iniciais da infecção é de extrema importância (BASSO, 2013). Porém, a correlação entre a imunidade protetora e o controle parasitário não é dependente apenas das respostas imunes do hospedeiro, mas também da cepa e do inóculo de *T. cruzi* (ESCH; PETERSON, 2013).

Após a entrada no hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* rapidamente infectam macrófagos locais, fibroblastos, células musculares e adipócitos (ESCH; PETERSON, 2013). Além disso, o parasita induz uma intensa resposta inflamatória que possui um papel crucial na patogênese da doença com

recrutamento de células NK (*natural killer*), macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B (BASSO, 2013).

Um evento crítico durante o período inicial da doença é a resposta imune inata mediada pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como, os macrófagos e as células dendríticas. O reconhecimento de *T. cruzi* por estes tipos celulares ocorre através dos numerosos receptores *Toll-like* (TLRs), tais como, TLR2 e TLR9, presentes nestas células que reconhecem glicoconjugados de membrana do parasita e/ou DNA e assim tornam-se ativadas (OUAISSI *et al.*, 2002; BAFICA *et al.*, 2006). Após ativação, estas células secretam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, expressam receptores co-estimulatórios, e aumentam a endocitose e morte intracelular do parasita através da liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (BASSO, 2013; CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014).

Inicialmente, macrófagos ativados produzem IL-12, que atua nas células NK induzindo a produção de IFN- $\gamma$ , que por sua vez aumenta a produção de IL-12, TNF- $\alpha$  e NO (óxido nítrico) nos macrófagos, contribuindo assim para a eliminação de *T. cruzi* (CAMARGO *et al.*, 1997). No mesmo momento, ambas as células sintetizam citocinas reguladoras, tais como, IL-10 e IL-4, a fim de reduzir os efeitos nocivos da resposta imune exacerbada (SATHLER-AVELAR *et al.*, 2009). Assim, os macrófagos além de terem um papel indispensável na resposta imune primária, eliminando o parasita, participam do processo

de homeostase tecidual, controlando a intensidade da resposta inflamatória.

Macrófagos e células dendríticas que endocitaram o parasita subsequentemente induzem uma forte resposta humoral e celular contra *T. cruzi* (CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014). Assim, à medida que a infecção progride, a resposta imune adaptativa também é necessária à eliminação e controle parasitários (BASSO, 2013; ESCH; PETERSON, 2013).

Após 15 dias de infecção, inicia-se a imunidade humoral com a ativação policlonal de linfócitos B e a hipergamaglobulinemia, principalmente de IgM (ANTAS *et al.*, 1999). Modelos experimentais infectados por *T. cruzi* com deficiência de células B e de anticorpos, apresentam alta parasitemia e baixa taxa de sobrevivência (KUMAR; TARLETON, 1998). Porém, estudos recentes têm demonstrado que a maioria dos linfócitos B ativados não sintetizam anticorpos específicos durante os primeiros dias de infecção pelo *T. cruzi*, mas que este fenômeno ocorre no final da fase aguda (BERMEJO *et al.*, 2010).

Diferentes isotipos de imunoglobulinas, principalmente da classe IgG, estão envolvidos na eliminação local e sistêmica do parasita através de mecanismos como fixação do complemento, aglutinação e citotoxicidade. Assim, o papel protetor dos anticorpos na eliminação de *T. cruzi* está associado à capacidade de reconhecerem抗ígenos do parasita, formarem agregados que fixam o complemento, aumentarem a opsonização e os mecanismos citotóxicos (TAKEHARA; MOTA, 1991).

APCs, tais como, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B têm um papel essencial na geração de linfócitos T efetores, que produzem diferentes citocinas envolvidas na polarização das respostas imunes Th1 ou Th2 (CARDILLO *et al.*, 2007). Linfócitos T CD4+ e T CD8+ efetores são capazes de migrar dos linfonodos aos tecidos e exercem uma forte resposta imune associada ao controle de *T. cruzi*. Estes tipos celulares secretam IFN- $\gamma$ , que por sua vez ativa os macrófagos a fim de exercerem atividade microbicida através da produção de NO (BASSO, 2013). Durante a infecção, grandes quantidades de células T CD8+ são geradas, circulam nos lugares de persistência parasitária a fim de encontrar o antígeno, onde exercem funções efetoras e tornam-se células de memória (TZELEPIS *et al.*, 2007). A redução parasitária bem como a alta inflamação estão diretamente associadas à presença destas células (FONSECA *et al.*, 2007; TZELEPIS *et al.*, 2007)

Células Th1 são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto células Th2 possuem função anti-inflamatória e são envolvidas na resposta mediada por anticorpos (BASSO, 2013). A produção adequada de citocinas pró-inflamatórias, tais como, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-18, é essencial ao controle da infecção promovida por *T. cruzi*. IL-12 e IL-18 produzidas por células dendríticas e macrófagos promovem o desenvolvimento de células Th1 que produzem IFN- $\gamma$ , enquanto IL-4 induz a expansão de células Th2 e de alta quantidade de IL-10. IL-10 e TGF- $\beta$ , por sua vez, parecem inibir a síntese de NO dependente de IFN- $\gamma$  e assim estão associadas ao

aumento na susceptibilidade a infecção por *T. cruzi* (SILVA *et al.*, 1991; GAZZINELLI *et al.*, 1992; HOLSCHER *et al.*, 2000). Já a citocina IL-17 e as células T regulatórias (Treg) controlam a resposta imune exacerbada na doença de Chagas, já que regulam a diferenciação de células de perfil Th1, o recrutamento de células inflamatórias e a miocardite induzida pelo parasita no tecido cardíaco (MARIANO *et al.*, 2008; GUEDES *et al.*, 2010).

Em altas concentrações, o NO produzido pelos macrófagos inibe a síntese de IL-12 e a apoptose, contribuindo na regulação do balanço Th1/Th2 uma vez que as células Th1 são mais suscetíveis a este processo do que as células Th2 (XIAO *et al.*, 2008). Além disso, esta regulação favorece a proliferação de células Treg durante a infecção experimental aguda por *T. cruzi* e inibe a expressão de moléculas envolvidas na adesão e migração celular (BASSO, 2013). NO exerce sua função citotóxica no *T. cruzi* afetando fatores de crescimento e destruindo amastigotas intracelulares. Porém em excesso, NO apresenta efeitos nocivos nos tecidos do hospedeiro (SILVA *et al.*, 2003).

Assim, durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, a indução da resposta inflamatória de perfil Th1 tem um papel crucial no controle do parasita (CUNHA-NETO *et al.*, 1998). Porém, se a ativação clássica dos macrófagos dependente de IFN- $\gamma$  e de TNF- $\alpha$  não for regulada, pode causar severos danos teciduais no hospedeiro, tornando a produção de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  fundamental, uma vez que estas citocinas modulam a ação do NO, das EROs e das citocinas pró-

inflamatórias (BASSO, 2013). Portanto, com o intuito de controlar a infecção por *T. cruzi*, um balanço entre a resposta imune Th1 e Th2 é necessário (BASSO *et al.*, 2004).

De fato, muitos estudos a respeito das citocinas induzidas pela infecção causada por *T. cruzi* apontam o conceito de que a proteção e a patologia chagásicas compartilham os mesmos mecanismos efetores imunológicos subjacentes baseados na predominância da resposta Th1 (CUNHA-NETO *et al.*, 1998). Neste contexto, qualquer rompimento no balanço entre respostas pró- e anti-inflamatórias pode ser deletério ao hospedeiro (ESPER *et al.*, 2014).

As características da fase aguda são um resultado do controle parasitário realizado pelas respostas imune humoral e celular e pela interação de suas citocinas. Entretanto, a defesa do hospedeiro contra *T. cruzi* pode diminuir ao longo do tempo ou ser suprimida por elementos provenientes do próprio parasita. Esta imunossupressão inespecífica que ocorre durante os primeiros estágios de infecção e a capacidade do parasita em se adaptar e evadir desta resposta permite que o mesmo invada células e dissemine-se, causando a incompleta erradicação parasitária e resultando na fase crônica da doença (MARTIN; TARLETON, 2004; BASSO, 2013).

Provavelmente, em resposta a persistência parasitária, citocinas pró-inflamatórias de perfil Th1, tais como, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , são produzidas ao longo da fase crônica da doença de Chagas (ABEL *et al.*, 2001; CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014). No entanto, na fase indeterminada da doença, os pacientes apresentam mínima inflamação

no miocárdio com altos níveis de citocina regulatória IL-10 além de baixos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (HIGUCHI *et al.*, 1987; SOUZA *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2014). Já na fase crônica caracterizada pela patologia cardíaca, intensa resposta inflamatória é observada e relacionada à altos níveis das citocinas de perfil Th1; IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (REIS *et al.*, 1993; ABEL *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2014). Tal resposta é atribuída à ação direta do parasita e/ou à reações autoimunes induzidas por *T. cruzi* no tecido (CUNHA-NETO *et al.*, 1998; BASSO, 2013). Diferentes estudos indicam que a exposição ao antígeno isolado do parasita é suficiente para induzir autoimunidade e dano cardíaco, ainda que fatores imunes adicionais, incluindo a resposta imune dominante Th1/Th17, sejam necessários para induzir inflamação cardíaca (BASSO, 2013).

O infiltrado inflamatório observado no coração de pacientes que desenvolvem CCC é rico em células T CD4+ e T CD8+ com predomínio do subtipo CD8+ (HIGUCHI *et al.*, 1993). Além disso, esses pacientes apresentam uma forte resposta imune Th1 associada a diminuição de células Treg e Th17 em relação aos pacientes crônicos com a forma clínica indeterminada da doença (NOGUEIRA *et al.*, 2012; CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014). Assim, a habilidade em controlar a resposta inflamatória exacerbada de perfil Th1 pelas células Treg e Th17 é “perdida” nos pacientes cardíacos, sendo a principal causa da intensa miocardite observada no quadro clínico mais grave da doença de Chagas crônica (DUTRA; GOLLOB, 2008).

A matriz de colágeno intersticial no miocárdio rodeia e suporta os cardiomiócitos e a microcirculação coronária, sendo sua integridade crítica ao funcionamento adequado do coração. Alterações na matriz de colágeno podem prejudicar as propriedades mecânicas do miocárdio e a função ventricular (MILTING *et al.*, 2008). Na doença de Chagas, como consequência do processo inflamatório encontrado no miocárdio durante a infecção, a fibrose é evidente e contribui ao remodelamento cardíaco (SOARES *et al.*, 2010). Como resultado, as características histopatológicas do coração chagásico incluem sinais típicos de miocardite crônica difusa que são detectados pelos aglomerados de células T, citocinas de perfil Th1, números variados de células B e de macrófagos, hipertrofia dos cardiomiócitos, fibrose intersticial difusa e morfologia alterada dos miócitos (HABERLAND *et al.*, 2013; CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014). Dados sugerem que a miocardite frequentemente observada no coração de portadores da CCC tem o principal papel patogênico na progressão da doença (CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014).

Em resumo, danos ao sistema nervoso, toxicidade celular devido ao *T. cruzi* e/ou a seus produtos, alterações microvasculares induzidas pelo parasita, ativação de células B policlonais, ativação de resposta associada a células T induzida por antígenos do *T. cruzi* e autoimunidade, conduzem a patogênese da doença de Chagas crônica sintomática.

### 1.3.1. IL-3, IL-7 e IL-9 na resposta imunológica contra *T. cruzi*

Apesar de diversos estudos elucidarem os diferentes papéis de variadas citocinas tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa durante a infecção com *T. cruzi*, pouco se sabe a respeito das citocinas IL-3, IL-7 e IL-9 neste contexto.

Ho e colaboradores (1992) observaram inibição na replicação de *T. cruzi* ao tratarem macrófagos humanos e murinos infectados com IL-3 *in vitro*. O mecanismo pelo qual IL-3 induziu esta atividade microbicida parece estar associado, pelo menos parcialmente, ao aumento na capacidade oxidativa destas células. Além disso, esta atividade foi similar à apresentada pela citocina IFN-γ, sabidamente conhecida por controlar a carga parasitária de *T. cruzi* tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SILVA *et al.*, 1992; CARDILLO *et al.*, 1996; CAMARGO *et al.*, 1997; ALIBERTI *et al.*, 2001).

Considerando a citocina IL-7, apenas três estudos correlacionaram sua presença e/ou de seu receptor com a infecção por *T. cruzi* durante a fase crônica da doença. Fonseca e colaboradores (2007) sugeriram que o acúmulo de células T CD8+ no tecido cardíaco de pacientes com CCC pode ocorrer devido à produção de IL-7 e de IL-15 *in situ* bem como à expressão de seus receptores. Adicionalmente, durante a infecção crônica em camundongos, células T CD8+ de memória específicas à *T. cruzi* apresentaram alta expressão de CD127 (IL-7Ra) e de CD122 (IL-15Rβ), sendo auto-renováveis em resposta à IL-7 e à IL-15. Além disso, tais células mostraram-se funcionalmente responsivas uma vez que produziram IFN-γ quando re-estimuladas e

expandiram-se após desafio, indicando a existência de células T CD8+ de memória responsivas mediante estímulo das citocinas IL-7 e IL-15 na infecção crônica (BIXBY; TARLETON, 2008). Por outro lado, Albareda e colaboradores (2015) ao analisarem pacientes cronicamente infectados em diferentes estágios clínicos da doença de Chagas, observaram aumento no nível sérico de IL-7 e menor capacidade de resposta a esta citocina, associada ao aumento na severidade da doença, indicando um possível mecanismo de exaustão de células T durante a fase crônica da doença mediada pelo receptor de IL-7.

Já em relação a citocina IL-9, nenhum estudo realizado até o momento avaliou sua atividade durante a doença de Chagas. A produção desta citocina foi inicialmente associada ao fenótipo Th2 e tem sido frequentemente relacionada às doenças atópicas, autoimunes, inflamatórias intestinais e infecções por helmintos. Porém estudos recentes têm demonstrado sua influência na resposta imune mediada pelas células Th1, Th17 e Treg (NOELLE; NOWAK, 2010; GOSWAMI; KAPLAN, 2011; SCHMITT *et al.*, 2014; KAPLAN *et al.*, 2015). Conforme descrito no subtópico anterior, o predomínio da resposta Th1 em detrimento da resposta mediada pelas células Th17 e Treg, está diretamente associado ao pior quadro clínico da doença de Chagas crônica (REIS *et al.*, 1993; ABEL *et al.*, 2001; DUTRA; GOLLOB, 2008; SOUSA *et al.*, 2014). Além disso, um balanço entre as respostas Th1 e Th2 é necessário ao controle de *T. cruzi* com menor dano tecidual durante a fase aguda da doença (CUNHA-NETO *et al.*, 1998; BASSO *et al.*, 2004; BASSO, 2013). Assim, sugere-se que a citocina IL-9 possa

ter um papel fundamental tanto na imunidade protetora quanto na imunopatológica da doença de Chagas.

Estudos envolvendo a atividade de IL-3, IL-7 e IL-9 durante a doença de Chagas são fundamentais na compreensão sobre o processo de controle parasitário e da ação protetora e/ou prejudicial dessas citocinas no hospedeiro. Além disso, o entendimento dos mecanismos imunológicos mediados por estas citocinas que estão envolvidos no desenvolvimento da doença pode contribuir para o estabelecimento de novas intervenções terapêuticas a fim de prevenir a doença de Chagas e tratar suas formas sintomáticas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento de camundongos C57BL/6 com as citocinas murinas recombinantes IL-3, IL-7 ou IL-9 durante a fase aguda da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Verificar a positividade média da parasitemia dos animais infectados após 10 dias de infecção;
- Analisar a sobrevivência, a morbidade e a variação de peso corporal dos animais infectados e tratados bem como de seus respectivos grupos controle durante 30 dias;
- Analisar o processo inflamatório no baço, fígado e coração dos animais infectados e tratados após 30 dias de infecção;
- Avaliar a fibrose cardíaca induzida por *T. cruzi* nos animais infectados e tratados após 30 dias de infecção;
- Quantificar a presença de mastócitos no tecido cardíaco dos animais infectados e tratados bem como de seus respectivos grupos controle após 30 dias de infecção;
- Avaliar o perfil de citocinas séricas pró- e anti-inflamatórias dos animais infectados e tratados após 10, 20 e 30 dias de infecção.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Camundongos C57BL/6 fêmeas de 8 – 12 semanas de idade foram mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) na Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob condições padrão de luminosidade (12 horas de luz; 12 horas na ausência de luz), temperatura controlada ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) com comida e água *ad libitum*. Todos os experimentos e procedimentos com animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU, sob o número de licença 042/13 (ANEXO 1).

#### 3.2. *Trypanosoma cruzi*

Formas tripomastigotas derivadas de cultura de tecido (TCT) da cepa Y de *T. cruzi* foram cultivadas e isoladas a partir da infecção *in vitro* de células Vero conforme previamente descrito (BRAGA *et al.*, 1993). Em suma, essas células foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) contendo L-glutamina and D-glicose (4500 mg/L), bicarbonato de sódio (2000 mg/L), e suplementado com tampão HEPES (2380 mg/L), piruvato de sódio, soro fetal bovino (2,5%), penicilina (60 mg/L), gentamicina (40 mg/L) e estreptomicina (10 mg/L). As garrafas de cultura foram mantidas em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### 3.3. Delineamento experimental

Camundongos fêmeas C57BL/6 foram infectados intraperitonealmente com  $4.0 \times 10^5$  TCT de *T. cruzi* cepa Y. Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (n = 6): não infectado e não tratado (grupo controle do experimento), infectado e não tratado (grupo controle dos tratamentos), não infectado e tratado com IL-3, não infectado e tratado com IL-7, não infectado e tratado com IL-9, infectado e tratado com IL-3, infectado e tratado com IL-7 e infectado e tratado com IL-9. Diariamente parâmetros clínicos dos animais, tais como, mortalidade, morbidade e variação no peso corporal foram observados. Os escores de morbidade foram calculados considerando as seguintes características: pelo macio e brilhante, animal ativo (escore 0); pelo arrepiado, animal curvado e/ou relutante em se movimentar (escore 1); pelo duro e muito arrepiado, animal estático (escore 2) (BARTLEY *et al.*, 2006). Após 10 dias de infecção realizou-se a parasitemia dos animais infectados, coletando 5 µL de sangue da veia caudal para a quantificação de parasitas circulantes no sangue e confirmação da infecção (CORRAL; PETRAY, 2001).

As citocinas recombinantes murinas IL-3 (BD Pharmingen<sup>TM</sup>, San Jose, CA, Canada), IL-7 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ou IL-9 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foram utilizadas no tratamento em uma concentração de 2,5 ng/g de peso corporal do animal, diluídas em tampão fosfato (PBS). Os camundongos foram tratados intraperitonealmente a cada 72 horas durante 15 dias após a positividade média da parasitemia. Como grupo controle negativo do

tratamento, animais foram tratados somente com o veículo (PBS). No 30º dia pós-infecção (d.p.i.), que compreende a fase aguda da infecção, os animais foram anestesiados com Ketamina (Syntec Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil) e Xilazina (Schering-Plough Coopers, Cotia, SP, Brasil) pela via intraperitoneal e eutanaziados por deslocamento cervical. Amostras de tecido foram coletadas para análises histopatológicas (infiltrado inflamatório e fibrose) e quantificação de mastócitos. Já amostras de sangue foram coletadas para a dosagem sérica de citocinas por CBA (*cytometric bead assay*). Em resumo, a Figura 2A esquematiza o delineamento experimental utilizado neste estudo.

### **3.4. Análises histopatológicas**

Amostras de tecidos do coração, fígado e baço foram fixadas em formalina tamponada 10%, desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (TOLOSA *et al.*, 2003). Cortes teciduais com 4 µm de espessura (40 µm de distância entre as secções) de cada órgão foram obtidos em micrótomo, montados em lâminas de vidro e corados para observação em microscópio de luz.

#### **3.4.1. Quantificação do infiltrado inflamatório**

As secções coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) foram analisadas quanto à intensidade do infiltrado inflamatório tecidual conforme descrito previamente (LIMA; MINOPRIO, 1996). Em suma, o

escore inflamatório foi atribuído de acordo com a extensão da inflamação e é representado como unidades arbitrárias, sendo: 4, frequente e muito intenso; 3, frequente e intenso; 2, ocasional e atenuado; 1, raro e fraco e 0, ausente. Todas as análises foram feitas com a objetiva de 40x de aumento, em ensaio duplo cego de três secções histológicas por animal.

### **3.4.2. Quantificação da fibrose cardíaca**

Com o intuito de avaliar a fibrose cardíaca induzida por *T. cruzi* mediante os tratamentos aplicados, cortes foram submetidos à coloração por Picrossirus Red, uma vez que esta coloração permite identificar as fibras de colágeno em magenta, conforme previamente descrito (FREITAS-FILHO *et al.*, 2006). Para a análise computacional, imagens digitais foram obtidas a partir de 40 áreas aleatórias de cada corte por meio do microscópio de luz binocular com câmera acoplada Leica DM500 (Leica Microsystems Inc., Wetzlar, HE, Alemanha) no aumento de 40x. Posteriormente, a análise da quantidade de fibras colágenas foi realizada por meio do software Image J (HADI *et al.*, 2011).

### **3.5. Quantificação de mastócitos cardíacos**

Cortes histológicos do coração foram corados com Azul de Toluidina para contagem de mastócitos tanto desgranulados quanto granulados por microscopia de luz, utilizando objetiva de 40x de aumento (HAMMAN *et al.*, 1994). O software Image J foi utilizado para

mensuração da área do corte histológico a partir de imagens capturadas no microscópio de luz binocular com câmera acoplada Leica DM500 (Leica Microsystems Inc., Wetzlar, HE, Alemanha). Assim, os dados foram normalizados, considerando a área total analisada de cada corte. As análises foram feitas em duas secções histológicas por animal, utilizando seis animais por grupo experimental.

### **3.6. Dosagem sérica de citocinas**

A quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no soro de camundongos durante a infecção antes e durante os tratamentos (10, 20 e 30 d.p.i.), foi feita por CBA (*cytometric bead assay*) seguindo as recomendações do fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Brevemente, os soros dos animais foram misturados v/v com esferas conjugadas com os anticorpos de captura e com anticorpos de detecção marcados com fluoróforos. Após incubação de 2 horas, as amostras foram lavadas e mensuradas no citômetro FACSCanto-II (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) e analisadas pelo software FACSDiva (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) por interpolação dos dados na curva padrão.

### **3.7. Análise estatística**

Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., SanDiego, CA, EUA). Os grupos foram avaliados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov (KS) e analisados pelo teste *two-way* ANOVA seguido do pós-teste de

comparação múltipla de Bonferroni ou pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de comparação múltipla de Dunnet, quando apropriados. A curva de sobrevivência foi analisada pelos testes de Quiquadrado e Long-rank. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão dos grupos experimentais para todos os parâmetros avaliados, exceto os resultados do infiltrado inflamatório que foram expressos em mediana. Valores de  $p<0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### **3.8. Normas de biossegurança**

Todos os procedimentos, incluindo a coleta do material biológico, utilização dos reagentes e dos equipamentos, bem como manuseio e conduta com os animais experimentais foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas em Mineo e colaboradores (2005).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Todos os tratamentos diminuíram o ganho de peso dos animais não infectados com *T. cruzi*, porém não houve alteração na morbidade**

O efeito dos tratamentos com IL-3, IL-7 ou IL-9 nos camundongos C57BL/6 infectados ou não com *T. cruzi*, foi avaliado diariamente através de parâmetros clínicos, tais como, alteração de peso corporal (Figura 2B e 2C) e escore de morbidade (Figura 2D). Observou-se que

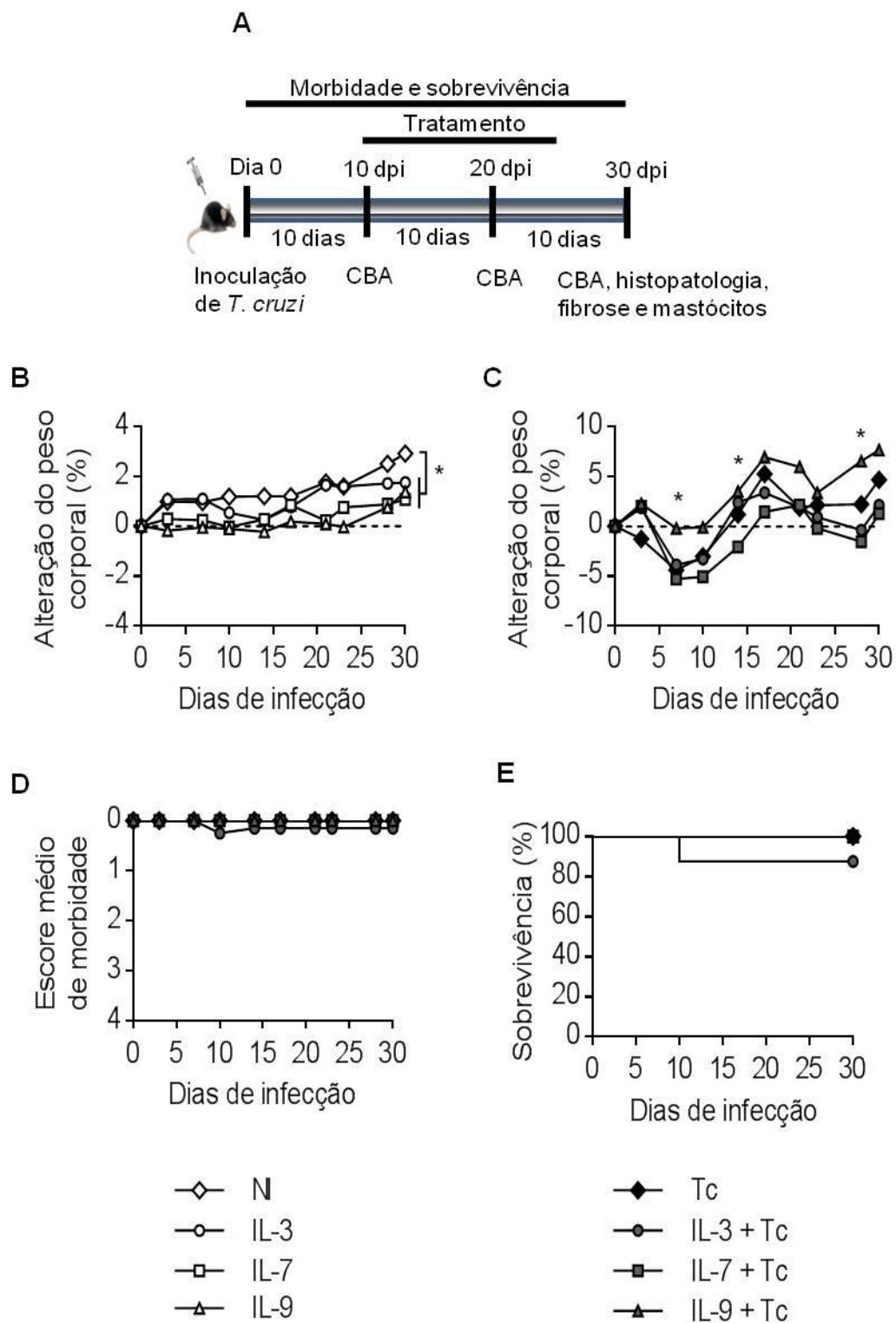
os animais não infectados e tratados apresentaram menor ganho porcentual de peso corporal quando comparados aos animais não infectados e não tratados, principalmente os animais tratados com IL-9 (Figura 2B). Por outro lado, os animais infectados e tratados com IL-9 apresentaram um maior aumento porcentual de peso corporal em relação aos animais infectados e tratados com IL-7 (Figura 2C) nos dias 4, 14 e 28 após infecção.

O escore médio de morbidade dos animais não infectados bem como dos infectados com *T. cruzi* de todas as condições experimentais manteve-se inferior a um, sugerindo que os tratamentos não influenciaram negativamente neste parâmetro clínico (Figura 2D). Assim, embora os tratamentos tenham diminuído o peso dos animais não infectados com *T. cruzi* e apenas o tratamento com IL-9 ter aumentando este parâmetro nos animais infectados, não houve correlação destes dados com a morbidade.

#### **4.2. Todos os animais infectados com *T. cruzi* apresentaram parasitemia média positiva aos 10 d.p.i. embora a taxa de sobrevivência não tenha sido alterada**

O nível de parasitas sanguíneos e a sobrevivência dos animais infectados com *T. cruzi* são importantes parâmetros avaliados que facilitam o entendimento sobre a relação parasita-hospedeiro. A fim de verificar se a inoculação de *T. cruzi* havia infectado os animais, realizou-se a parasitemia após 10 d.p.i. e observou-se que todos os animais estavam de fato infectados.

Após 30 dias de infecção todos os grupos experimentais apresentaram 100% de sobrevivência, exceto os animais infectados e tratados com IL-3 que apresentaram aproximadamente 80% de sobrevivência, o que não resultou em diferença significante (Figura 2E). Tais dados sugerem que apesar da baixa virulência da cepa Y de *T. cruzi* utilizada neste estudo demonstrada pela baixa mortalidade dos animais, os tratamentos não influenciam neste parâmetro clínico.



**Figura 2. O tratamento com IL-3, IL-7 ou IL-9 não alterou os parâmetros clínicos em camundongos infectados com *T. cruzi*.** Camundongos C57BL/6 foram infectados com  $4.0 \times 10^5$  tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y e tratados com as citocinas recombinantes murinas IL-3, IL-7 ou IL-9 (2,5 ng/g) a cada 72 horas durante 15 dias após a positividade média da parasitemia (A). Parâmetros clínicos, tais como, alteração de peso corporal (B e C), escore médio de morbidade (D) e sobrevivência (F) foram observados diariamente até 30 dias após a infecção. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com pelo menos três camundongos por grupo. NI: camundongos não infectados; Tc: camundongos infectados com *T. cruzi*; d.p.i.: dias pós-infecção; CBA: *cytometric bead assay*.

\*Two-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni,  $p < 0,05$ .

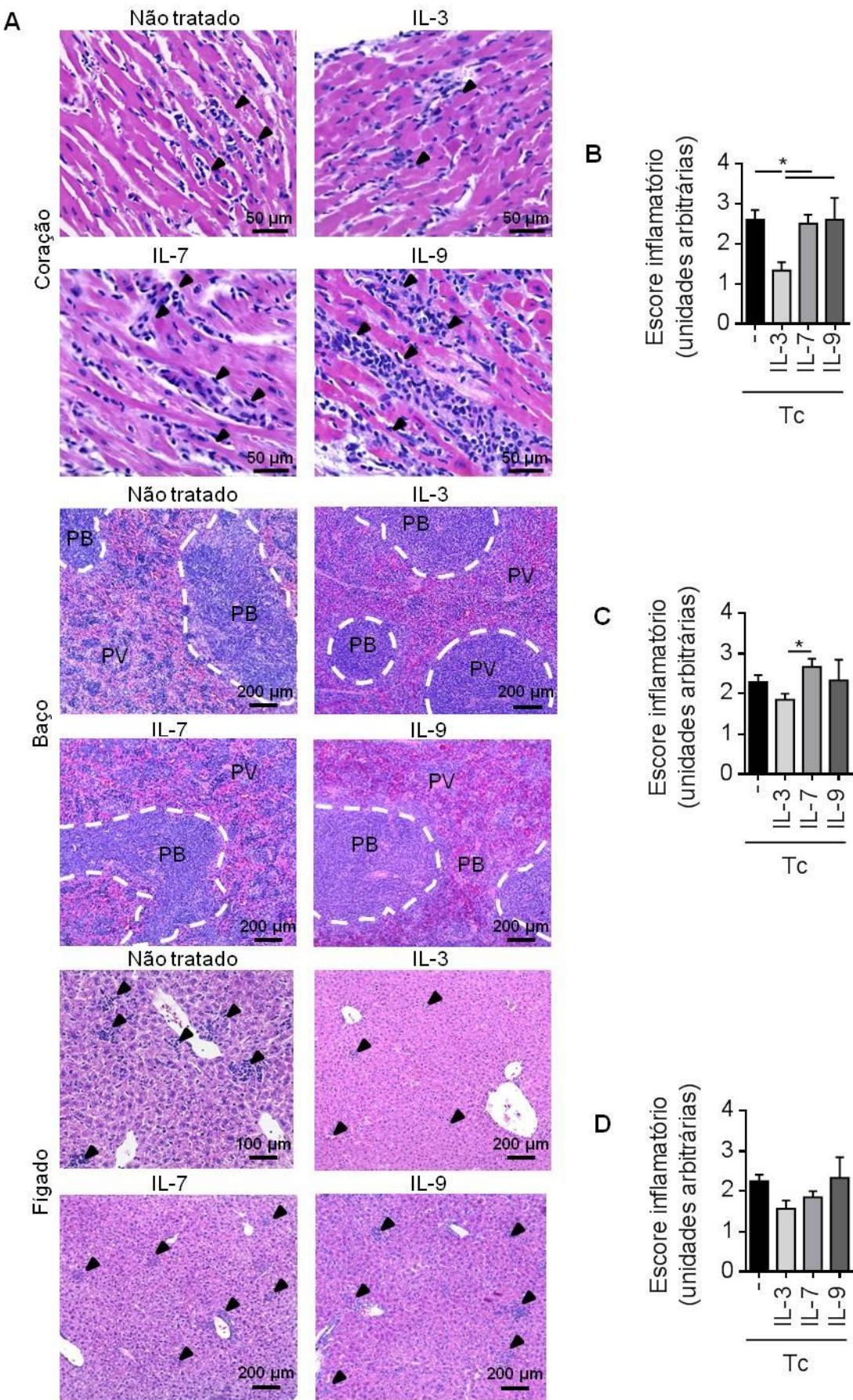
#### **4.3. O tratamento dos animais infectados com IL-3 reduziu a inflamação induzida por *T. cruzi* no coração**

As alterações histológicas no coração, baço e fígado dos animais infectados e tratados bem como dos grupos controle não infectados e tratados foram examinadas com intuito de determinar se os tratamentos poderiam afetar a extensão do dano tecidual induzido por *T. cruzi* após 30 dias de infecção. Secções teciduais obtidas foram analisadas e atribuíram-se escores de diferentes parâmetros histopatológicos referentes à doença de Chagas.

As lesões cardíacas dos animais infectados foram intensas e frequentes constituídas de amplo infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleadas (Figura 3A). Animais infectados e tratados com IL-7 ou IL-9 bem como os apenas infectados apresentaram semelhante intensidade das lesões no coração. Por outro lado, as lesões cardíacas dos animais infectados e tratados com IL-3 foram suaves e mostraram-se significativamente menores do que as lesões encontradas nas outras condições experimentais (Figura 3B). Ninhos de amastigota não foram observados no tecido cardíaco de nenhum grupo infectado. Estes resultados mostram que o tratamento com IL-3 diminuiu a inflamação induzida por *T. cruzi* no coração.

Os baços dos camundongos infectados com *T. cruzi* apresentaram alterações inflamatórias que alteraram a arquitetura histológica, provocando desorganização dos centros germinativos e hiperplasia da polpa branca (Figura 3A). Os animais infectados e tratados com IL-7 ou IL-9 bem como os animais apenas infectados apresentaram lesões no

baço com semelhante gravidade (Figura 3C). Porém os animais infectados que foram submetidos ao tratamento com IL-3 apresentaram alterações menos intensas neste órgão em relação aos animais infectados e tratados com IL-7 (Figura 3C).



**Figura 3. O tratamento dos animais infectados com IL-3 reduziu a inflamação induzida por *T. cruzi* no coração.** Camundongos C57BL/6 foram infectados com  $4.0 \times 10^5$  tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y e tratados com as citocinas recombinantes murinas IL-3, IL-7 ou IL-9 (2,5 ng/g) a cada 72 horas durante 15 dias após a positividade média da parasitemia. Após 30 dias de infecção, coração, baço e fígado foram analisados e escores inflamatórios foram atribuídos de acordo com a extensão da inflamação. Fotomicrografias representativas das alterações histológicas de cada órgão dos animais infectados e não tratados; infectados e tratados com IL-3; infectados e tratados com IL-7 e infectados e tratados com IL-9 coradas por H&E (A). Quantificação do escore inflamatório do coração (B), baço (C) e fígado (D) dos animais infectados. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com pelo menos três camundongos por grupo. Seta preta: foco inflamatório; linha pontilhada: limite dos centros germinativos esplênicos; PB: polpa branca; PV: polpa vermelha; Tc: camundongos infectados com *T. cruzi*. \*Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunnet,  $p < 0,05$ .

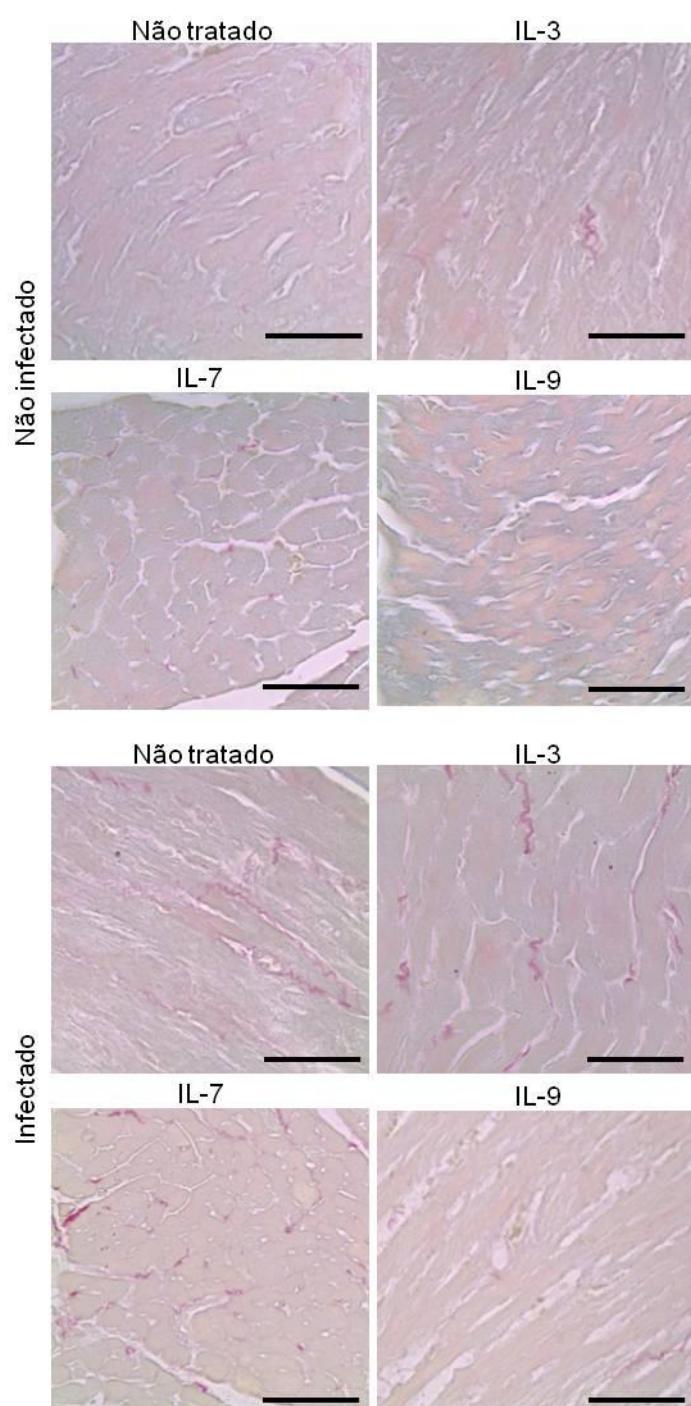
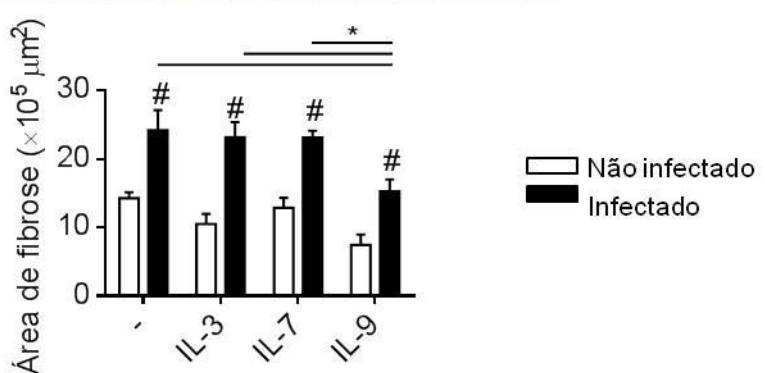
Aos 30 dias de infecção com *T. cruzi*, o fígado apresentou infiltrado de células inflamatórias, predominantemente mononucleadas, dispostos em focos espalhados por áreas portal e de parênquima (Figura 3A). Independentemente do tratamento aplicado, todos os animais infectados apresentaram lesões hepáticas similares quando comparados entre si (Figura 3D). Não observou-se diferença no número de células inflamatórias entre os camundongos controle não infectados independente do tratamento aplicado (dados não mostrados).

#### **4.4. O tratamento com IL-9 diminuiu a fibrose cardíaca nos animais infectados com *T. cruzi***

A neoformação tecidual conectiva fibrosa ou fibrose é uma das alterações frequentes que ocorre de maneira lenta e progressiva na doença de Chagas em resposta à inflamação crônica induzida por *T. cruzi* (DE LIMA PEREIRA *et al.*, 2007). Assim, visando avaliar se os diferentes tratamentos aqui aplicados possuíram algum papel na alteração da fibrose induzida por *T. cruzi*, amostras cardíacas de todos os grupos experimentais foram coletadas e analisadas quanto a área ocupada pelas fibras colágenas, 30 dias pós-infecção (Figura 4A).

Como esperado, todos os animais infectados, independentemente do tratamento aplicado, apresentaram maior fibrose quando comparados com seus respectivos controles não infectados (Figura 4B). Os animais infectados e tratados com IL-9 apresentaram uma diminuição significante na quantidade de fibrose no tecido cardíaco em relação a todos os outros grupos experimentais infectados, sugerindo

um possível papel modulador de IL-9 na fibrose dos animais infectados (Figura 4B).

**A****B**

**Figura 4. O tratamento com IL-9 diminuiu a fibrose cardíaca nos animais infectados com *T. cruzi*.** Camundongos C57BL/6 foram infectados com  $4.0 \times 10^5$  tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y e tratados com as citocinas recombinantes murinas IL-3, IL-7 ou IL-9 (2,5 ng/g) a cada 72 horas durante 15 dias após a positividade média da parasitemia. Após 30 dias de infecção, o coração foi analisado quanto à área ocupada pelas fibras colágenas. Fotomicrografias representativas das fibras colágenas cardíacas de todos os grupos experimentais coradas por Picrossirius Red (A). Quantificação da área de fibrose ocupada pelas fibras colágenas (B). Os dados são representativos de dois experimentos independentes com pelo menos três camundongos por grupo. Barra de escala = 100  $\mu$ m. \*Significância estatística entre os grupos infectados; #Significância estatística entre os grupos não infectados e infectados (Two-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

#### **4.5. Os tratamentos não alteraram a quantidade de mastócitos no coração dos animais infectados com *T. cruzi***

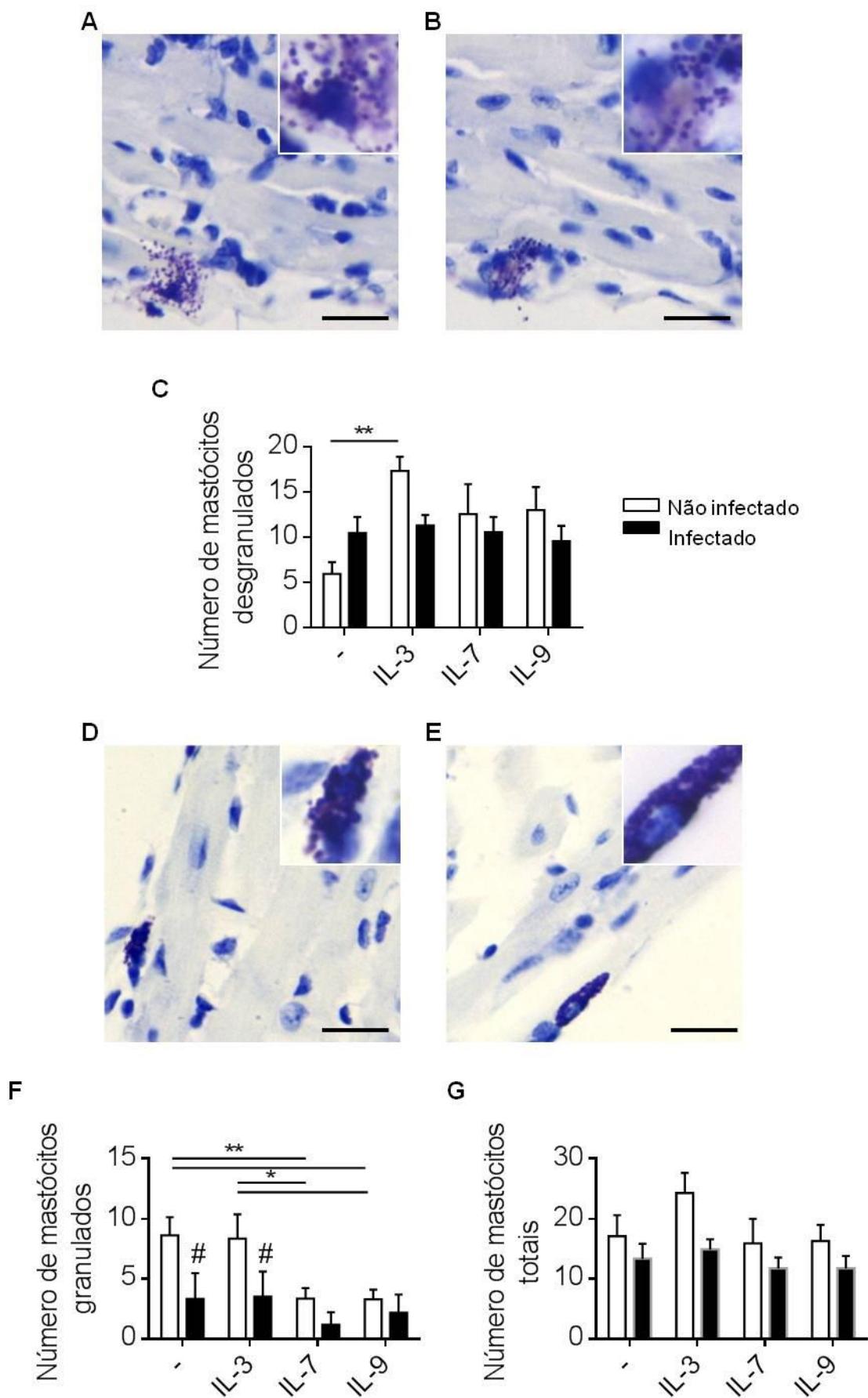
Como foi observado maior fibrose no coração de todos os animais infectados independente do tratamento aplicado e a densidade de mastócitos teciduais pode ser um indicador da proliferação de fibroblastos bem como do desenvolvimento de fibrose local (DE LIMA PEREIRA *et al.*, 2007), quantificaram-se os mastócitos cardíacos de todos os grupos experimentais inclusive dos grupo controle aos 30 dias após infecção.

Observou-se a presença de mastócitos desgranulados no coração tanto de animais não infectados quanto de infectados (Figura 5A – 5C). Todos os animais infectados, independentemente do tratamento aplicado, apresentaram semelhante quantidade de mastócitos desgranulados no tecido cardíaco (Figura 5C). Assim os tratamentos parecem não influenciar na quantidade de mastócitos desgranulados nos animais infectados. Entretanto, o tratamento com IL-3 nos animais não infectados, aumentou显著mente a quantidade de mastócitos desgranulados em relação aos animais controle não tratados e não infectados (Figura 5C).

Quanto à presença de mastócitos granulados, estes também foram observados em todos os grupos experimentais (Figura 5D – 5F). Os animais não tratados e infectados apresentaram quantidade similar de mastócitos granulados quando comparados aos animais tratados com IL-3 e infectados (Figura 5F). Tal quantidade mostrou-se显著mente menor em relação aos seus respectivos grupos controle não infectados, sugerindo que a infecção por *T. cruzi* diminuiu a quantidade de mastócitos granulados nestes grupos (Figura 5F). Por outro lado, o tratamento com IL-7 ou IL-9 nos animais não infectados também diminuiu a

quantidade de mastócitos granulados no coração em relação tanto aos animais não infectados e não tratados quanto aos não infectados e tratados com IL-3 (Figura 5F).

A quantidade de mastócitos totais, não apresentou diferença significante entre os grupos experimentais analisados (Figura 5G).



**Figura 5. O tratamento com IL-3, IL-7 ou IL-9 não alterou a quantidade de mastócitos no coração dos animais infectados com *T. cruzi*.** Camundongos C57BL/6 foram infectados com  $4.0 \times 10^5$  tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y e tratados com as citocinas recombinantes murinas IL-3, IL-7 ou IL-9 (2,5 ng/g) a cada 72 horas durante 15 dias após a positividade média da parasitemia. Após 30 dias de infecção, o coração foi analisado quanto à quantidade de mastócitos desgranulados e granulados. Fotomicrografias representativas de animais não infectados e não tratados (A e D); infectados e não tratados (B e E) mostrando a presença de mastócitos desgranulados (A e B) e granulados (D e E) coradas por Azul de Toluidina. Quantificação de mastócitos desgranulados (C), granulados (F) e totais (G). Os dados são representativos de dois experimentos independentes com pelo menos três camundongos por grupo. Barra de escala = 20  $\mu$ m.  
\*Significância estatística entre os grupos não infectados; #Significância estatística entre os grupos não infectados e infectados (Two-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

#### **4.6. Os tratamentos alteraram o perfil das citocinas nos animais infectados com *T. cruzi***

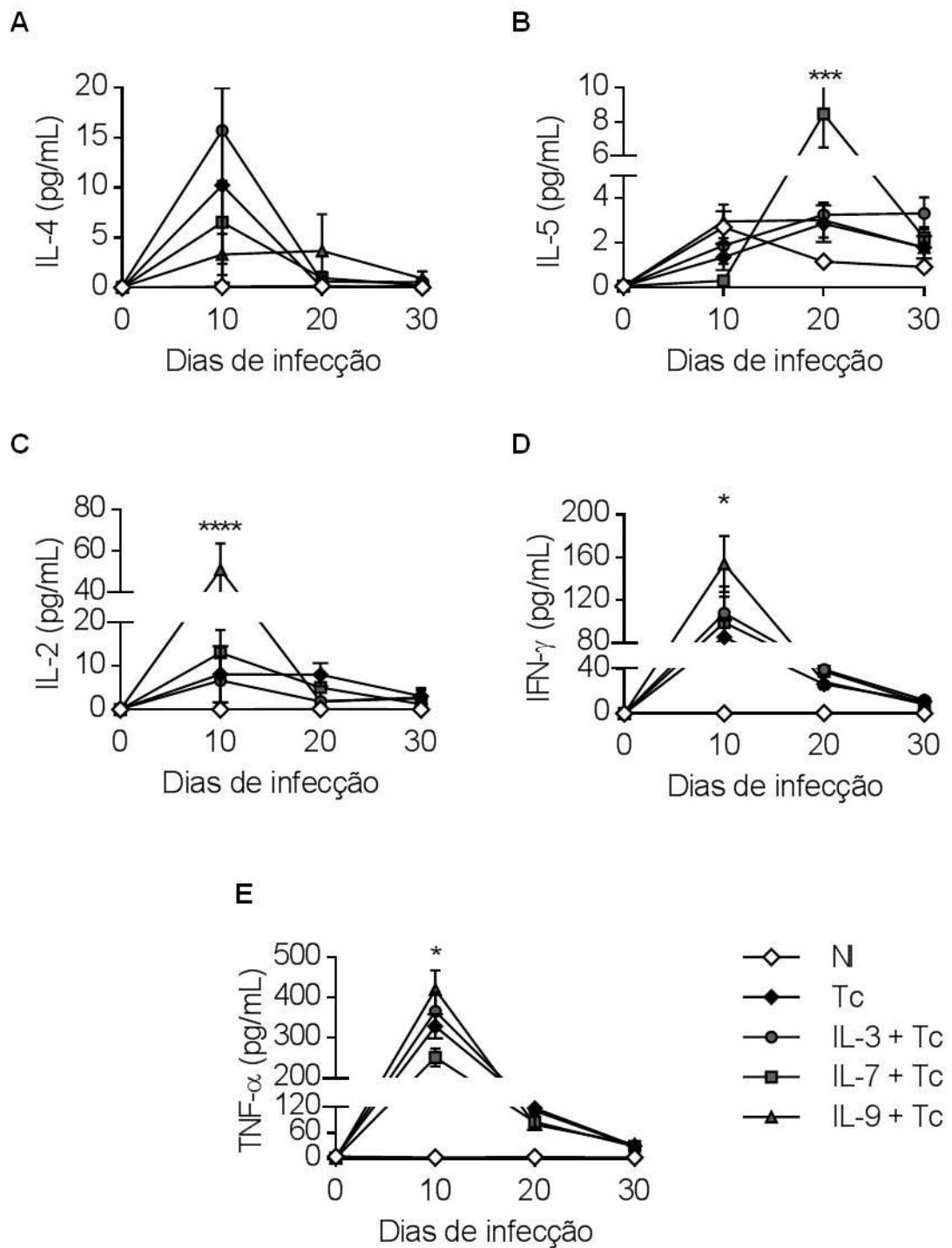
Devido à diminuição da parasitemia nos animais infectados e tratados, hipotetizamos que houvesse alguma alteração no perfil de citocinas presentes no soro que explicasse tal fenômeno. Assim, amostras de soro de todos os grupos experimentais foram coletadas nos dias 10, 20 e 30 após a infecção e submetidas a quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por CBA.

Em relação as citocinas de polarização para resposta de perfil Th2 (IL-4 e IL-5), os tratamentos não induziram alteração significante na produção de IL-4 (Figura 6A), apesar de seu notável aumento nos animais infectados e tratados com IL-3 aos 10 d.p.i. Já em relação a citocina IL-5, o tratamento com IL-7 aumentou sua dosagem nos animais infectados em relação aos outros grupos aos 20 d.p.i. (Figura 6B).

Foi observado que o tratamento com IL-9 induziu aumento na produção de IL-2, citocina de estimulação da proliferação de células T, nos animais infectados em relação aos outros grupos experimentais infectados aos 10 d.p.i. (Figura 6C). Semelhantemente, o mesmo foi observado para as citocinas de polarização para resposta de perfil Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) nos animais infectados aos 10 d.p.i. quando comparados aos outros grupos experimentais infectados (Figura 6D e 6E). Além disso, a infecção por *T. cruzi* induziu a produção significativa de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em todos os grupos de animais infectados em relação

aos animais não infectados aos 10 e 20 d.p.i. independentemente dos tratamentos adotados (dados não mostrados).

De modo geral, o tratamento com IL-7 induziu aumento da citocina IL-5 de perfil Th2 aos 20 d.p.i. e o tratamento com IL-9 apresentou semelhante efeito nas citocinas IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  de perfil Th1 nos animais infectados aos 10 d.p.i.



**Figura 6. O tratamento com IL-3, IL-7 ou IL-9 alterou o perfil das citocinas nos animais infectados com *T. cruzi*.** Camundongos C57BL/6 foram infectados com  $4.0 \times 10^5$  tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y e tratados com as citocinas recombinantes murinas IL-3, IL-7 ou IL-9 (2,5 ng/g) a cada 72 horas durante 15 dias após a positividade média da parasitemia. Após 10, 20 e 30 dias de infecção o soro dos camundongos foram coletados e submetidos a quantificação das citocinas IL-4 (A), IL-5 (B), IL-2 (C), IFN-γ (D) e TNF-α (E) por CBA. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com pelo menos três camundongos por grupo. NI: camundongos não infectados; Tc: camundongos infectados com *T. cruzi*. \*Two-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni,  $p < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

A regulação da resposta imunológica é necessária à proteção adequada contra o estabelecimento e proliferação de muitos agentes infecciosos, inclusive do protozoário *T. cruzi*. Consequentemente, a elucidação dos mecanismos subjacentes relacionados ao papel das citocinas na resposta imune auxiliará na compreensão sobre como a resposta protetora difere da patogênica induzida por este parasita, que por sua vez resulta em inflamação exacerbada e doença crônica. Considerando o papel central desempenhado pela atividade das citocinas na resistência precoce à infecção por *T. cruzi*, o presente estudo analisou o papel de IL-3, IL-7 e IL-9 na fase aguda da infecção experimental em camundongos. É importante ressaltar que até o momento nenhum estudo avaliou o papel destas citocinas *in vivo* durante a fase aguda da infecção.

IL-3 é uma citocina derivada de linfócitos T que contribui na viabilidade e na diferenciação das células progenitoras hematopoiéticas envolvidas na monocitopoiése (ELLIOT *et al.*, 1989; OTTMAN *et al.*, 1990). Todos os tratamentos adotados neste estudo, inclusive o de IL-3, diminuiu a parasitemia dos animais infectados em relação aos animais apenas infectados e não tratados, o que está de acordo com vários estudos que confirmam que as citocinas associadas ao perfil Th1 são elementos essenciais para a resistência precoce contra a doença de Chagas aguda (BASSO, 2013). Além disso, macrófagos humanos ativados por IL-3 apresentaram um maior aumento em sua capacidade oxidativa e assim inibiram a replicação de *Leishmania amazonensis* e

de *T. cruzi* *in vitro*, efeitos estes comparáveis aos do IFN- $\gamma$  (HO *et al.*, 1992).

Ainda que antígenos isolados de *T. cruzi* induzam autoimunidade e dano cardíaco, a resposta imune dominante Th1/Th17 que ocorre frente à presença do parasita durante a fase aguda da infecção é a principal responsável pela inflamação cardíaca (BASSO, 2013). Assim, a queda na parasitemia observada nos animais infectados e tratados com IL-3 pode estar diretamente relacionada à significativa diminuição no quadro inflamatório induzido por *T. cruzi* no tecido cardíaco destes animais.

Parte de nossos resultados são contrários à este possível papel protetor de IL-3 acima sugerido. Embora não significante, o tratamento dos animais infectados com IL-3 sugeriu uma provável tendência em aumentar o nível sérico de IL-4 em relação aos outros grupos experimentais. Situações associadas ao aumento na síntese desta citocina de perfil Th2 *in vivo* resultam em maior susceptibilidade a infecção por *T. cruzi* (HOFT *et al.*, 1993; ABRAHAMSON *et al.*, 2000). Além disso, o tratamento de macrófagos murinos infectados com *T. cruzi* com IL-4 aumentou a infecção parasitária *in vitro* (GOLDEN; TARLETON, 1991). Tal correlação poderia explicar, pelo menos parcialmente, alguns dos nossos resultados que indicaram, apesar da insignificância estatística, a piora na morbidade com consequente queda na taxa de sobrevivência no grupo de animais infectados e tratados com IL-3.

O aumento, *homing* e maturação dos progenitores dos mastócitos são influenciados por diversas citocinas, destacando-se como mais importantes, o fator de células tronco (SCF) e a IL-3 (IHLE *et al.*, 1983; IEMURA *et al.*, 1994). Assim, o aumento observado neste estudo na quantidade de mastócitos desgranulados no coração dos animais não infectados e tratados com IL-3 em relação ao seu respectivo controle poderia ser parcialmente explicado.

Já a citocina IL-7 está envolvida na resposta T CD4 (ROSE *et al.*, 2010), na proliferação de células pró-B e no aumento de linfócitos T citotóxicos antígeno-específicos (SIN *et al.*, 2000). Além disso, células T naïve dependem de IL-7 para sobrevivência, desenvolvimento e proliferação homeostática (TAN *et al.*, 2001; MACKALL *et al.*, 2011). A administração de IL-7 recombinante humana à camundongos normais ou linfopênicos, primatas não-humanos e humanos resulta em proliferação generalizada, modulação dos subtipos periféricos e aumento na diversidade do repertório do receptor de células T (MACKALL *et al.*, 2011). Estes efeitos aumentam a perspectiva de que IL-7 poderia mediar benefícios terapêuticos em diversos cenários clínicos. Entretanto, apenas três estudos realizados até agora avaliaram o papel de IL-7 na infecção por *T. cruzi* sendo que todos analisaram a fase crônica da doença. Fonseca e colaboradores (2007) mostraram que a produção local de IL-7 e de IL-15 pode estar associada à manutenção e predomínio de células T CD8+ no tecido cardíaco, causando o dano tecidual característico da cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) em humanos. Além disso, células T CD8+ de

memória central específicas à *T. cruzi* apresentaram alta expressão de CD127 (IL-7R $\alpha$ ) e de CD122 (IL-15R $\beta$ ), sendo auto-renováveis em resposta à IL-7 e à IL-15. (BIXBY; TARLETON, 2008). Recentemente, foi demonstrado a ativação de IL-7R (CD127 e CD132) tanto em células T CD4+ quanto em T CD8+ após infecção com *T. cruzi* *in vitro*. Porém neste mesmo estudo observou-se aumento no nível sérico de IL-7 em pacientes cronicamente infectados e uma menor capacidade de resposta à IL-7 associada ao aumento na severidade da doença, indicando um possível mecanismo de exaustão de células T durante a fase crônica da doença (ALBAREDA *et al.*, 2015). Além disso, o tratamento com IL-7 *in vivo* agravou o curso clínico da leishmaniose cutânea murina em camundongos BALB/c por estimular a linfopoiese de células B, o que não ocorreu nos camundongos C57BL/6 semelhantemente tratados e infectados (GESSNER *et al.*, 1995). Em concordância, nossos resultados demonstraram que o tratamento com IL-7 *in vivo* não prejudicou o curso clínico da doença de Chagas murina durante a fase aguda nos camundongos C57BL/6 geneticamente resistentes, uma vez que, embora tenha diminuído o peso corporal dos animais infectados não alterou os outros parâmetros clínicos analisados. Resultado este que pode estar relacionado ao que foi descrito por Bryan e colaboradores (2010), onde a proliferação das populações de células B que respondem especificamente a *T. cruzi* com baixa resposta policlonal, alta produção de IFN- $\gamma$  e prevalência de perfil Th1 está associada à linhagem C57BL/6. Adicionalmente, os nossos resultados apresentaram menor parasitemia nos animais

infectados e tratados com IL-7 em relação aos animais apenas infectados, sugerindo um possível papel de controle desta citocina na quantidade de parasitas sanguíneos circulantes, o que não condiz com o semelhante escore inflamatório e a elevada dosagem sérica de IL-5 apresentados por estes animais quando comparados aos animais apenas infectados. Lembrando que IL-5 é uma citocina de perfil Th2, relacionada à respostas imunes inflamatórias e alérgicas provenientes principalmente de eosinófilos, tais como, asma e dermatite atópica (MOLFINO *et al.*, 2011). Apesar de apenas um estudo realizado até agora ter descrito o aumento da secreção de IL-5 por células humanas após infecção com *T. cruzi* *in vitro*, nenhum trabalho avaliou seu papel funcional na doença de Chagas (MARTELLO *et al.*, 2013).

IL-9 é uma citocina pleiotrópica originalmente identificada como fator de proliferação de mastócitos e de células T murinas produzida principalmente por células Th (UYTTENHOVE *et al.*, 1988; HULTNER *et al.*, 1990). A principal fonte de IL-9 é o linfócito T, incluindo suas linhagens de longa duração, antígeno-específicas e naïve (GOSWAMI; KAPLAN, 2011). Esta citocina tem sido frequentemente associada às doenças atópicas, autoimunes, inflamatórias intestinais e infecções por helmintos, porém estudos recentes têm demonstrado seu papel na inflamação mediada por Th1/Th17 e nas respostas Treg (NOELLE; NOWAK, 2010; GOSWAMI; KAPLAN, 2011; SCHMITT *et al.*, 2014; KAPLAN *et al.*, 2015). Muitas evidências sugerem a existência de um subtipo de células T especializado em produzir IL-9, chamado Th9, no qual tal produção é regulada por uma série de citocinas e fatores de

transcrição, tais como, IL-2, STAT5, IL-4, STAT6, TGF- $\beta$  e GATA3 (GOSWAMI; KAPLAN, 2011; KAPLAN *et al.*, 2015). Apesar de IL-9 atuar como fator de susceptibilidade na infecção por *Leishmania major* uma vez que promoveu a resposta prejudicial do tipo 2/Th2 em camundongos BALB/c (ARENDSSE *et al.*, 2005), nossos dados sugerem efeito benéfico desta citocina na infecção por *T. cruzi* já que o tratamento com IL-9 diminuiu a parasitemia dos animais tratados e infectados em relação aos animais apenas infectados. Além disso, no nosso modelo experimental, a administração de IL-9 nos animais infectados induziu um significante aumento nos níveis séricos das citocinas de perfil Th1; IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , relacionadas à resposta protetora contra *T. cruzi*.

Sabe-se que IL-2 é fundamental à produção de IL-9 em células T CD4+ e ao desenvolvimento de células Th9 (SCHMITT *et al.*, 2014; KAPLAN *et al.*, 2015). Diferentes estudos, em concordância com nossos resultados, apontam o papel protetor de IL-2 na infecção com *T. cruzi*. Albareda e colaboradores (2013) descreveram que a expansão de células T induzida por IL-2, controla a expansão de *T. cruzi* e limita o dano tecidual periférico em crianças. Adicionalmente, o parasita tem a habilidade de reduzir a produção de IL-2 e a expressão do seu receptor IL-2R $\alpha$  nas células T, restringindo a resposta Th1 protetora e beneficiando sua replicação (DÍAZ *et al.*, 2015).

Jager e colaboradores (2009) também demonstraram o aumento de IFN- $\gamma$  proveniente de células Th9 em modelos murinos de encefalomielite alérgica experimental (EAE) após a transferência

adotiva para estes animais de células Th específicas diferenciadas *in vitro* sob condições promotoras de perfil Th9. Além disso, a alta produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  associada à eliminação de *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção tem sido amplamente demonstrada, o que está de acordo com nossos resultados (SILVA *et al.*, 1992; CARDILLO *et al.*, 1996; ALIBERTI *et al.*, 2001). Camargo e colaboradores (1997) observaram que macrófagos ativados por antígenos de *T. cruzi* induzem uma cascata de citocinas: inicialmente eles produzem IL-12, que atua nas células NK induzindo a produção de IFN- $\gamma$ , que por sua vez aumenta a produção de IL-12, TNF- $\alpha$  e NO nos macrófagos, contribuindo à eliminação do parasita. Assim, no que refere-se a *T. cruzi*, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  reforçam a ativação das respostas imunes efetoras inata e adaptativa, resultando na morte efetiva do parasita e em forte resposta inflamatória tecidual nos locais de replicação parasitária, incluindo o miocárdio (GOLGHER; GAZZINELLI, 2004). Em concordância com nossos resultados que demonstraram alto nível de miocardite nos animais infectados e tratado com IL-9 assim como nos animais apenas infectados.

A cicatrização desregulada leva à fibrose, na qual fibroblastos sintetizam matriz extracelular em excesso, principalmente colágeno, que originam cicatrizes levando à perda funcional do órgão acometido, quadro frequentemente encontrado na cardiomiopatia chagásica crônica (SOARES *et al.*, 2010; BARRON; WYNN, 2011). Muitas evidências relacionam a fibrose com a resposta imune de perfil Th2, caracterizada principalmente pelas citocinas IL-4, IL-13 e TGF- $\beta$  que

estimulam os fibroblastos a sintetizarem colágeno (WYNN, 2008). Diversos genes conhecidos por estarem envolvidos nos mecanismos de cicatrização e fibrose são *up-regulados* nos animais que exibem inflamação polarizada-Th2 (HOFFMANN *et al.*, 2001; SANDLER *et al.*, 2003). Além disso, diversos modelos experimentais de fibrose têm documentado potente atividade anti-fibrótica de citocinas associadas ao perfil Th1, como IFN- $\gamma$  e IL-12. Na esquistossomose, enquanto o tratamento com IFN- $\gamma$  ou IL-12 não tem efeito no estabelecimento da infecção, a deposição de colágeno associada ao granuloma é significativamente diminuída (WYNN *et al.*, 1995). Resultados similares foram obtidos em modelos de fibrose pulmonar, renal e hepática (GURUJEYALAKSHMI; GIRI, 1995; OLDROYD *et al.*, 1999; KEANE *et al.*, 2000; POYNARD *et al.*, 2003). Como esperado, grande número de genes induzidos por IFN- $\gamma$  são *up-regulados* na resposta Th1, sem a ativação de genes associados à fibrose (HOFFMANN *et al.*, 2001; SANDLER *et al.*, 2003). Assim, a resposta Th2 ativa a deposição de colágeno, enquanto a resposta Th1 inibe este processo, indicando assim papéis opostos para estas respostas no reparo tecidual (WYNN, 2004; BORTHWICK *et al.*, 2013). Conforme dados obtidos neste estudo, o aumento das citocinas de perfil Th1 está de acordo com a diminuição da fibrose observados nos animais infectados e tratados com IL-9, sugerindo que o tratamento com IL-9 ao estimular citocinas de perfil Th1 controlou a parasitemia e diminuiu a fibrose induzida por *T. cruzi*, tendo assim um possível papel protetor durante a fase aguda da infecção.

Mastócitos apresentam um importante papel na formação do tecido conjuntivo, liberando mediadores que estimulam a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno (JORDANA, 1993; GARBUZENKO *et al.*, 2002). Apesar de diversos estudos terem descrito a correlação positiva entre a densidade destas células e a fibrose no esôfago (PEREIRA, 1972), cólon (PINHEIRO *et al.*, 2003) e língua (DE LIMA PEREIRA *et al.*, 2007) de pacientes chagásicos, nossos resultados não apresentaram tal relação uma vez que não se observou diferença estatística entre as quantificações de mastócitos cardíacos totais nos animais não infectados e nos animais infectados.

Meuser-Batista e colaboradores (2011) ao tratarem camundongos infectados com um estabilizador de mastócitos e observarem aumento na parasitemia, nos níveis de IFN- $\gamma$ , na mortalidade e nos danos cardíacos destes animais, demonstraram que os mastócitos são importantes no controle da infecção aguda por *T. cruzi*. Além disso, esses autores demonstraram redução destas células no peritônio e no coração durante o início da fase aguda da infecção e sugeriram tal fenômeno a diversos fatores, tais como, 1) secreção local reduzida dos fatores de sobrevivência de mastócitos, 2) expressão dos receptores de morte, e/ou 3) migração reduzida dos precursores sanguíneos dos mastócitos. Similarmente, nossos resultados demonstraram diminuição na quantidade de mastócitos totais em todos os camundongos infectados, embora sem significância estatística. Em concordância com Chapadeiro e colaboradores (1988) que também observaram diminuição no número de mastócitos cardíacos em ratos na fase aguda da

infecção. Porém outros estudos realizados em ratos e humanos cronicamente infectados demonstraram significante aumento destas células no coração, cólon e esôfago, sugerindo que o maior recrutamento de mastócitos está relacionado com a fase crônica da doença (ALMEIDA *et al.*, 1975; CABRAL *et al.*, 2002; PINHEIRO *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2015).

É importante salientar que a concentração das citocinas adotada neste estudo foi inferior às utilizadas na literatura até agora, o que poderia explicar as alterações dos parâmetros avaliados. Adotamos esta concentração fisiológica uma vez que o desenvolvimento do quadro clínico mais grave da doença de Chagas, a CCC, está associado a forte autoimunidade e resposta Th1, e o balanço entre as respostas Th1 e Th2 mostra-se adequado no controle da infecção (GUEDES *et al.*, 2009; GUEDES *et al.*, 2010; BASSO, 2013; SOUSA *et al.*, 2014).

A resposta imune do hospedeiro e a manipulação exercida pelo parasita nesta resposta são áreas-chave de estudo que devem ser entendidas a fim de alcançar as metas para desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes além de tratamentos que controlem esta importante doença. Embora esteja claro que cada citocina não atua isoladamente, mas compõe uma complexa rede de interação, o estudo do papel individual de cada uma é essencial na geração de conhecimento sobre a resposta imune do hospedeiro modulada pelo parasita.

## 6. CONCLUSÕES

- Os tratamentos com as citocinas recombinantes murinas IL-3, IL-7 ou IL-9 não alteraram os parâmetros clínicos analisados (mortalidade, morbidade e variação do peso corporal) dos animais infectados com *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção.
- O tratamento com a citocina recombinante murina IL-3 diminuiu a inflamação cardíaca nos animais infectados com *T. cruzi* na fase aguda da infecção.
- Os tratamentos com as citocinas recombinantes murinas IL-3, IL-7 ou IL-9 não alteraram a quantidade de mastócitos recrutados no tecido cardíaco dos animais infectados com *T. cruzi* na fase aguda da infecção.
- O tratamento com a citocina recombinante murina IL-7 aumentou a dosagem sérica de IL-5 nos animais infectados com *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção.
- O tratamento com a citocina recombinante murina IL-9 aumentou a dosagem sérica de citocinas de perfil Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e diminuiu a fibrose cardíaca nos animais infectados com *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção, sugerindo um possível papel protetor desta citocina neste contexto.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, L. C. J.; RIZZO, L. V.; IANNI, B.; ALBUQUERQUE, F.; BACAL, F.; CARRARA, D.; BOCCHI, E. A.; TEIXEIRA, H. C.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Chronic Chagas` disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- $\gamma$  response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Autoimmunity**, v. 17, p. 99-108, 2001.

ABRAHAMSON , I. A.; DA SILVA, A. P.; COFFMAN, R. L. Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 1975-1979, 2000.

ALBAREDA, M. C.; DE RISSIO, A. M.; TOMAS, G.; SERJAN, A.; ALVAREZ, M. G.; VIOTTI, R.; FICHERA, L.E.; ESTEVA, M. I.; POTENTE, D.; ARMENTI, A.; TARLETON, R. L.; LAUCELLA, S. A. Polyfunctional T cell responses in children in early stages of chronic *Trypanosoma cruzi* infection contrast with monofunctional responses of long-term infected adults. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, p. e2575, 2013.

ALBAREDA, M. C.; PEREZ-MAZLIAH, D.; NATALE, M. A.; CASTRO-EIRO, M.; ALVAREZ, M. G.; VIOTTI, R.; BERTOCCHI, G.; LOCOCO, B.; TARLETON, R. L.; LAUCELLA, S. A. Perturbed T cell IL-7 receptor signaling in chronic Chagas disease. **The Journal of Immunology**, v. 194, p. 3883-3889, 2015.

ALIBERTI, J. C. S.; SOUTO, J. T.; MARINO, A. P. M. P.; LANNES-VIEIRA, J.; TEIXEIRA, M. M.; FARBER, J.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S.. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in Interferon- $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor-R1-Deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. **American Journal of Pathology**, v. 158, p. 1433-1440, 2001.

ALMEIDA, H. O.; PEREIRA, F. E.; TAFURI, W. L. Mast cells in Chagas' chronic cardiopathy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 17, p. 5-9, 1975.

ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R.; CHIARI, E.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 100, p. 163-172, 1999.

AÑEZ, N.; CRISANTE, G.; DA SILVA, F. M.; ROJAS, A.; CARRASCO, H.; UMEZAWA, E. S.; STOLF, A. M.; RAMÍREZ, J. L.; TEIXEIRA, M. M. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. **Tropical Medicine and International Health**, v. 9, p. 1319-1326, 2004.

ANTAS, P. R.; MEDRANO-MERCADO, N.; TORRICO, F.; UGARTE-FERNANDEZ, R.; GÓMEZ, F.; CORREA OLIVEIRA, R.; CHAVES, A. C.;

ROMANHA, A. J.; ARAÚJO-JORGE, T. C. Early, intermediate, and late acute stages in Chagas' disease: a study combining anti-galactose IgG, specific serodiagnosis, and polymerase chain reaction analysis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p. 308-314, 1999.

APT, W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 4, p. 243-253, 2010.

ARCE-FONSECA, M.; BALLINAS-VERDUGO, M. A.; REYES, P. A.; ARANDA-FRAUSTRO, A.; MONTEÓN, V. M. Autoantibodies to human heart conduction system in Chagas' disease. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 5, p. 233-236, 2005.

ARENDS, B.; VAN SNICK, J.; BROMBACHER, F. IL-9 is a susceptibility factor in *Leishmania major* infection by promoting detrimental Th2/Type 2 responses. **Journal of Immunology**, v. 174, p. 2205-2211, 2005.

BAFICA, A.; SANTIAGO, H. C.; GOLDSZMID, R.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T.; SHER, A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 3515-3519, 2006.

BARRON, L.; WYNN, T. A. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. **American Journal of Physiology**, v. 300, p. G723-G728, 2011.

BARTLEY, P. M.; WRIGHT, S.; SALES, J.; CHIANINI, F.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* *in vivo*. **Parasitology**, v. 135, p. 421-432, 2006.

BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 20, p. 1-10, 2013.

BASSO, B.; CERVETTA, L.; MORETTI, E.; CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Acute *Trypanosoma cruzi* infection: IL-12, IL-18, TNF, sTNFR and NO in *T. rangeli*-vaccinated mice. **Vaccine**, v. 22, p. 1868-1872, 2004.

BASTOS, C. J.; ARAS, R.; MOTA, G.; REIS, F.; DIAS, J. P., DE JESUS, R. S.; FREIRE, M. S.; DE ARAÚJO, E. G.; PRAZERES, J.; GRASSI, M. F. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. e711, 2010.

BERMEJO, D. A.; AMEZCUA-VESELY, M. C.; MONTES, C. L.; MERINO, M. C.; GEHRAU, R. C.; CEJAS, H.; ACOSTA-RODRÍGUEZ, E. V.; GRUPPI, A. BAFF mediates splenic B cell response and antibody production in experimental Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. e679, 2010.

BIXBY, L. M.; TARLETON, R. L. Stable CD8+ T cell memory during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, v. 181, p. 2644-2650, 2008.

BLACK, C. L.; OCAÑA, S.; RINER, D. Household risk factors for *Trypanosoma cruzi* seropositivity in two geographic regions of Ecuador. **Journal of Parasitology**, v. 93, p. 12-16, 2007.

BORTHWICK, L. A.; WYNN, T. A.; FISHER, A. J. Cytokine mediated tissue fibrosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1832, p. 1049-1060, 2013.

BRAGA, M. E.; GALVÃO, L. M. C.; CHIARI, E.; MARTINS, M. S. Difference in susceptibility to lysis between clones of the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 529-534, 1993.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review Microbiology**, v. 27, p. 347-382, 1973.

BRYAN, M. A.; GUYACH, S. E.; NORRIS, K. A. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. e733, 2010.

BUCKNER, F. S.; NAVABI, N. Advances in Chagas disease drug development: 2009 – 2010. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, p. 609-616, 2010.

CABRAL, H. R.; NOVAK, I. T.; GLOCKER, T. M.; CASTRO VIERA, G. A. Chagas cardiopathy: identification and quantification of infiltrating cells in the hearts of cardiac death patients of different ages. **Revista de La Facultad de Ciencias Médicas (Córdoba, Argentina)**, v. 59, p. 83-89, 2002.

CAMARGO, M. M.; ANDRADE, A. C.; ALMEIDA, I. C.; TRAVASSOS, L. R.; GAZZINELLI, R. T. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. **Journal of Immunology**, v. 159, p. 6131-6139, 1997.

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J. C.; REED, S. G.; SILVA, J. S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 128-134, 1996.

CHAPADEITO, E.; BERALDO, P. S.; JESUS, P. C.; OLIVEIRA JÚNIOR, W. P.; JUNQUEIRA JÚNIOR, L. F. Cardiac lesions in Wistar rats inoculated with various strains of *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, p. 95-103, 1988.

CLAY, G. M.; SUTTERWALA, F. S.; WILSON, M. E. NLR proteins and parasitic disease. **Immunology Research**, v. 59, p. 142-152, 2014.

CORRAL, R. S.; PETRAY, P. B. CpG DNA as a Th1-promoting adjuvant in immunization against *Trypanosoma cruzi*. **Vaccine**, v. 19, p. 234-242, 2001.

COURA, J. R. Chagas disease: control, elimination and erradication. Is it possible? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 962-967, 2013.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C.; FERNANDES, O.; VALENTE, S. A.; MILES, M. A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 171-176, 2002.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, p. S6-S7, 2010.

CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, Article ID 683230, 2014.

CUNHA-NETO, E.; RIZZO, L. V.; ALBUQUERQUE, F.; ABEL, L.; GUILHERME, L.; BOCCHI, E.; BACAL, F.; CARRARA, D.; IANNI, B.; MADY, C.; KALIL, J. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas`disease cardiomyopathy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 133-137, 1998.

DE LIMA PEREIRA, S. A.; DOS SANTOS, V. M.; RODRIGUES, D. B. R.; DA CASTRO, E. C. C.; DOS REIS, M. A.; TEIXEIRA, V. P. A. Quantitative analysis of fibrosis and mast cells in the tongue of chronic chagasic patients: autopsy study. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 37, p. 229-233, 2007.

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 86, p. 197-283, 1984.

DIAS, J. C. P. Control of Chagas disease in Brazil. **Parasitology Today**, v. 3, p. 336-341, 1987.

DIAZ, P. R.; MUCCI, J.; MEIRA, M. A.; BOGLIOTTI, Y.; MUSIKANT, D.; LEGUIZAMON, M. S.; CAMPETELLA, O. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase prevents elicitation of Th1 cell response via interleukin 10 and

downregulates Th1 effector cells. **Infection and Immunity**, v, 83, p. 2099-2108, 2015.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, p. 287-292, 2008.

ELLIOT, M. J.; VADAS, M. A.; EQLINTON, J. M.; PARK, L. S.; TO, L. B.; CLELAND, L. G.; CLARK, S. C.; LOPEZ, A. F. Recombinant human interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor show common biological effects and binding characteristics on human monocytes. **Blood**, v. 74, p. 2349-2359, 1989.

ESCH, K.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, p. 58-85, 2013.

ESPER, L.; UTSCH, L.; SORIANI, F. M.; BRANT, F.; ARANTES, R. M. E.; CAMPOS, C. F.; PINHO, V.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M.; TANOWITZ, H. B.; VIEIRA, L. Q.; MACHADO, F. S. Regulatory effects of IL-18 on cytokine profiles and development of myocarditis during *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and Infection**, v. 16, p. 481-490, 2014.

ESPINOZA, B.; RICO, T.; SOSA, S.; OAXACA, E.; VIZCAINO-CASTILLO, A.; CABALLERO, M. L.; MARTÍNEZ, I. Mexican *Trypanosoma cruzi* I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-10, 2009.

FERNANDES, O.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; PINHO, A. P.; MOREL, C. M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; JANSEN, A. M. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. **Parasitology**, v. 118, p. 161-166, 1999.

FONSECA, S. G.; REIS, M. M.; COELHO, V.; NOGUEIRA, L. G.; MONTEIRO, S. M.; MAIRENA, E. C.; BACAL, F.; BOCCHIS, E.; GUILHERME, L.; ZHENG, X. X.; LIEW, F. Y.; HIGUCHI, M. L.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8+ T cells at heart lesions of human chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, p. 362-371, 2007.

FREITAS-FILHO, G. A.; SILVA, M. F. R.; BELETTI, M. E.; MACHADO, E. R.; SILVA, N. S. Efeito da irradiação laser de baixa potência Arsaneto de Gálio Alumínio (ASGAAL) de 785 nm sobre a cicatrização

de lesão muscular: estudo experimental. **Revista UNIVAP**, v. 13, p. 53-60, 2006.

GARBUZENKO, E.; NAGLER, A.; PICKHOLTZ, D.; GILLERY, P.; REICH, R.; MAGUART, F. X.; LEVI-SCHAFFER, F. Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 32, p. 237-246, 2002.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **European Journal of Immunology**, v. 22, p. 2501-2506, 1992.

GESSNER, A.; WILL, A.; VIETH, M.; SCHROPPEL, K.; ROLINGHOFF, M. Stimulation of B-cell lymphopoiesis by interleukin-7 leads to aggravation of murine leishmaniasis. **Immunology**, v. 84, p. 416-422, 1995.

GOLDEN, J. M.; TARLETON, R. L. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. **Experimental Parasitology**, v. 72, p. 391-402, 1991.

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

GOSWAMI, R.; KAPLAN, M. H. A brief history of IL-9. **Journal of Immunology**, v. 186, p. 3283-3288, 2011.

GUEDES, P. M. M.; GUTIERREZ, F.; R. S.; MAIA, F. L.; MILANEZI, C. M.; SILVA, G. K.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. e604., 2010.

GUEDES, P. M. M.; VELOSO, V. M.; AFONSO, L. C.; CALIARI, M. V.; CARNEIRO, C. M. DINIZ, L. F.; MARQUES-DA-SILVA, E. A.; CALDAS, I. S.; DO VALLE MATTA, M. A.; SOUZA, S. M.; LANA, M.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M.; BAHIA, M. T. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and low IL-10 production during the acute infection phase. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 130, p. 43-52, 2009.

GURUJEYALAKSHMI, G.; GIRI, S. N. Molecular Mechanisms of Antifibrotic Effect of Interferon Gamma in Bleomycin-Mouse Model of Lung Fibrosis: Downregulation of TGF- $\beta$  and Procollagen I and III Gene Expression. **Experimental Lung Research**, v. 21, p. 791-808, 1995.

HABERLAND, A.; SARAVIA, S. G. M.; WALLUKAT, G.; ZIEBIG, R.; SCHIMKE, I. Chronic Chagas disease: from basics to laboratory medicine. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 51, p. 271-294, 2013.

HADI, A. M.; MOUCHAERS, K. T. B.; SCHALIJ, I.; GRUNBERG, K.; GERRIT, A. M.; VONK-NOORDEGRAAF, A.; VAN DER LAARSE, W. J.; BELIEN, J. A. M. Rapid quantification of myocardial fibrosis: a new macro-based automated analysis. **Cellular Oncology**, v. 34, p. 343-354, 2011.

HAMMAN, K.; GRABBE, J.; WELKER, P.; HAAS, N.; ALGERMISSEN, B.; CZARNETZKI, B. M. Phenotypic evaluation of cultured human mast and basophilic cells and of normal human skin mast cells. **Archives of Dermatological Research**, v. 286, p. 380-385, 1994.

HIGUCHI, M. L.; GUTIERREZ, P. S.; AIELLO, V. D.; PALOMINO, S.; BOCCHI, E.; KALIL, J.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 423, p. 157-160, 1993.

HIGUCHI, M. L.; DE MORAIS, C. F.; BARRETO, A. C. P.; LOPES, E. A.; STOLF, N.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. The role of active myocarditis

in the development of heart failure in chronic Chagas`disease: a study based on endomyocardial biopsies. **Clinical Cardiology**, v. 10, p. 665-670, 1987.

HO, J. L.; REED, S. GG.; SOBEL, J.; ARRUDA, S.; HE, S. H.; WICK, E. A; GRABSTEIN, K. H. Interleukin-3 induces antimicrobial activity against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi* and tumoricidal activity in human peripheral blood-derived macrophages. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 1984-1993, 1992.

HOFFMANN, K. F.; McCARTY, T. C.; SEGAL, D. H.; CHIARAMONTE, M.; HESSE, M.; DAVIS, E. M.; CHEEVER, A. W.; MELTZER, P. S.; MORSE III, H. C.; WYNN, T. A. Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type-1 and type-2 cytokine-mediated inflammatory reactions. **The FASEB Journal**, v. 15, p. 2545-2547, 2001.

HOFT, D. F.; LYNCH, R. G.; KIRCHHOFF, L. V. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Immunology**, v. 151, p. 7038-7047, 1993.

HOLSCHER, C.; MOHRS, M.; DAI, W. J.; KOHLER, G.; RYFFEL, B.; SCHaub, G. A.; MOSSAMANN, H.; BROMBACHER, F. Tumor Necrosis Factor Alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected

interleukin 10-deficient mice. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 4075-4083, 2000.

HULTNER, L.; DRUEZ, C.; MOELLER, J.; UYTTEHOVE, C.; SCHMITT, E.; RUDE, E.; DORMER, P.; VAN SNICK, J. Mast cell growth-enhancing activity (MEA) is structurally related and functionally identical to the novel mouse T cell growth factor P40/TCGFIII (interleukin 9). **European Journal of Immunology**, v. 20, p. 1413-1416, 1990.

IEMURA, A.; TSAI, M.; ANDO, A.; WERSHIL, B. K.; GALLI, S. J. The *c-kit* ligand, stem cell factor, promotes mast cell survive by supressing apoptosis. **American Journal of Pathology**, v. 144, p. 321-328, 1994.

IHLE, J. N.; KELLER, J.; OROSZLAN, S.; HENDERSON, L. E.; COPELAND, T. D.; FITCH, F.; PRYSTOWSKY, M. B.; GOLDWASSER, E.; SCHRADER, J. W.; PALASZYNSKI, E.; DY, M. LEBEL, B. Biologic properties of homogeneous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, p cell-stimulating factor activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell-stimulating factor activity. **Journal of Immunology**, v. 131, p. 282-287, 1983.

JAGER, A.; DARDALHON, V.; SOBEL, A. R.; BETTELLI, E.; KUCHROO, V. K. Th1, Th17 and Th9 effector cells induce experimental autoimmune

encephalomyelitis with different pathological phenotypes. **Journal of Immunology**, v. 183, p. 7169-7177, 2009.

JORDANA, M. Mast cells and fibrosis – who's on first? **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 8, p. 7-8, 1993.

KAPLAN, M. H.; HUFFORD, M. M.; OLSON, M. R. The development and in vivo function of T helper 9 cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, p. 295-307, 2015.

KEANE, M. P.; BELPERIO, C. C.; BURDICK, M. D.; STRIETER, R. M. IL-12 attenuates bleomycin, induced pulmonary fibrosis. **American Journal of Physiology**, v. 281, p. L92-L97, 2001.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunology**, v. 20, p. 207-216, 1998.

LEY, V.; ANDREWS, N. W.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. **Journal of Experimental Medicinal**, v. 168, p. 649-659, 1988.

LIMA, E. C. S.; MINOPRIO, P. Chagas`Disease is attenuated in mice lacking  $\gamma\delta$  T cells. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 215-221, 1996.

MACKALL, C. L.; FRY, T. J.; GRESS, R. E. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 330-342, 2011.

MANOEL-CAETANO, F. S.; SILVA A. E. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. 2263-2274, 2007.

MARIANO, F. S.; GUTIERREZ, F. R. S.; PAVANELLI, W. R.; MILANEZI, C. M.; CAVASSANI, K. A.; MOREIRA, A. P.; FERREIRA, B. R.; CUNHA, F. Q.; CARDOSO, C. R.; SILVA, J. S. The involvement of CD4+ CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and Infection**, v. 10, p. 825-833, 2008.

MARTELLO, L. A.; WADGAONKAR, R. J.; GUPTA, R.; MACHADO, F. S.; WALSH, M. G.; MASCARENO, E.; TANOWITZ, H. B.; HASEEB, M. A. Characterization of *Trypanosoma cruzi* infectivity, proliferation, and cytokine patterns in gut and pancreatic epithelial cells mantained in vitro. **Parasitology Research**, v. 112, p. 4177-4183, 2013.

MARTIN, D.; TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 304-317, 2004.

MARTINS, P.R.; NASCIMENTO, R. D.; LISBOA, A. S.; MARTINELLI, P. M.; REIS, D. A. Neuroimmunopathology of *Trypanosoma cruzi*-induced megaesophagus: is there a role for mast cell proteases? **Human Immunology**, v. 75, p. 302-305, 2014.

MARTINS, P.R.; NASCIMENTO, R. D.; LOPES, J. G.; SANTOS, M. M.; DE OLIVEIRA, C. A.; DE OLIVEIRA, E. C.; MARTINELLI, P. M.; REIS, D. A. Mast cells in the colon of *Trypanosoma cruzi*-infected patients: are they involved in the recruitment, survival and/or activation of eosinophils? **Parasitology Research**, v. 114, p. 1847-1856, 2015.

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS, A. N. J.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 130, p.167–174, 2014.

MEJÍA-JARAMILLO, A. M.; PEÑA, V. H.; TRIANA-CHÁVEZ, O. *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of lineages I and II supports the predominance of lineage I in Colombia. **Experimental Parasitology**, v. 121, p. 83-91, 2009.

MEUSER-BATISTA, M.; CORRÊA, J. R.; CARVALHO, V. F.; BRITTO, C. F. D. P. C.; MOREIRA, O. C.; BATISTA, M. M.; SOARES, M. J.; FARIAS FILHO, F. A.; SILVA, P. M. R.; LANNES-VIEIRA, J.; SILVA, R. C.; HENRIQUES-PONS, A. Mast cell function and death in *Trypanosoma cruzi* infection. **The American Journal of Pathology**, v. 179, p. 1894-1904, 2011.

MILTING, H.; ELLINGHAUS, P.; SEEWALD, M.; CAKAR, H.; BOHMS, B.; KASSNER, A.; KÖRFER, R.; KLEIN, M.; KRUSKA, L.; EL BANAYOSY, A.; KRAMER, F. Plasma biomarkers of myocardial fibrosis and remodeling in terminal heart failure patients supported by mechanical circulatory support devices. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 27, p. 589-596, 2008.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU, 2005. 273p.

MOLFINO, N. A.; GOSSAGE, D.; KOLBECK, R.; PARKER, J. M.; GEBA, G. P. Molecular and clinical rationale for therapeutic targeting of interleukin-5 and its receptor. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 42, p. 712-737, 2012.

MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on surface of HeLa cells. **Experimental Parasitology**, v. 73, p. 1-14, 1991.

NOELLE, R. J.; NOWACK, E. C. Cellular sources and immune functions of interleukin-9. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 683-687, 2010.

NOGUEIRA, L.G.; SANTOS, R. H. B.; LANNI, B. M.; FIORELLI, A. I.; MAIRENA, E. C.; BENVENUTI, L. A.; FRADE, A.; DONADI, E.; DIAS, F.; SABA, B.; WANG, H. T. L.; FRAGATA, A.; SAMPAIO, M.; HIRATA, M. H.; BUCK, P.; MADY, C.; BOCCHI, E. A.; STOLF, N. A.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. e1867, 2012.

OLDROYD, S. D.; THOMAS, G. L.; GABBIANI, G.; EL NAHAS, M. Interferon- $\gamma$  inhibits experimental renal fibrosis. **Kidney International**, v. 56, p. 2216-2127, 1999.

OTTMAN, O. G.; GANSER, A.; SEIPELT, G.; EDER, M.; SCHULZ, G.; HOELZER, D. Effects of recombinant human interleukin-3 on human hematopoietic progenitor and precursor cells in vivo. **Blood**, v. 76, p. 1494-1502, 1990.

OUAISI, A.; GUILVARD, E.; DELNESTE, Y.; CARON, G.; MAGISTRELLI, G.; HERBAULT, N.; THIEBLEMONT, N.; JEANNIN, P.

The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. **The Journal of Immunology**, v. 168, p. 6366-6372, 2002.

PEREIRA, F. E. L. Estudo quantitativo dos mastócitos na musculatura do esôfago de chagásicos crônicos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 14, p. 30-32, 1972.

PINHEIRO, S. W.; RUA, A. M. O.; ETCHEBEHERE, R. M.; CANÇADO, C. G.; CHICA, J. E. L.; LOPES, E. R.; ADAD, S. J. Morphometric study of the fibrosis and mast cell count in the circular colon musculature of chronic Chagas patients with and without megacolon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 461-466, 2003.

POYNARD, T.; YUEN, M.; RATZIU, V.; LAI, C. L. Viral hepatitis C. **The Lancet**, v. 362, p. 2095-2100, 2003.

REIS, D. D.; JONES, E. M.; TOSTES, S. Jr.; LOPES, E. R.; GAZZINELLI, G.; COLLEY, D. G.; McCURLEY, T. L. Characterization of Inflammatory Infiltrates in Chronic Chagasic Myocardial Lesions: Presence of Tumor Necrosis Factor- $\alpha^+$  Cells and Dominance of

Granzyme A<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Lymphocytes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, p. 637-644, 1993.

ROSE, T.; PILLET, A. H.; LAVERQNE, V.; TAMIRIT, B.; LENORMAND, P.; ROUSSELLE, J. .; NAMANE, A.; THÈZE, J. Interleukin-7 compartmentalizes its receptor signaling complex to initiate CD4 T lymphocyte response. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 14898–14908, 2010.

SANDLER, N. G.; MENTINK-KANE, M. M.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. **The Journal of Immunology**, v. 171, p. 3655-3667, 2003.

SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 246-251, 2009.

SCHMITT, E.; KLEIN, M.; BOPP, T. Th9 cells, new players in adaptive immunity. **Trends in Immunology**, v. 35, p. 61-68, 2014.

SILVA, J. S.; MACHADO, F. S.; MASRTINS, G. A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. **Frontiers in Bioscience**, v 8, p. s314-325, 2003.

SILVA, J. S.; MORRISSEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; MOHLER, K. M.; ANDERSON, D.; REED, S. G. Interleukin 10 and Interferon  $\gamma$  regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 175, p. 169-174, 1992.

SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 174, p. 539-545, 1991.

SIN, J. I.; KIM, J.; PACHUK, C.; WEINEI, D. B. Interleukin7 can enhance antigen-specific cytotoxic-T-lymphocyte and/or Th2-type immune responses in vivo. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, p. 751-758, 2000.

SOARES, M. B. P.; DE LIMA, R. S.; ROCHA, L. L. ; VASCONCELOS, J. F.; ROGATTO, S. R.; DOS SANTOS, R. R.; IACOBAS, S.; GOLDENBERG, R. C.; IACOBAS, D. A.; TANOWITZ, H. B.; DE CARVALHO, A. C. C.; SPRAY, D. C. Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with Chronic

Chagasic Cardiomyopathy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, p. 416-426, 2010.

SOUSA, G. R.; GOMES, J. A. S.; FARES, R. C. G.; DAMÁSIO, M. P. S.; CHAVES, A. T.; FERREIRA, K. S.; NUNES, M. C. P.; MEDEIROS, N. I.; VALENTE, V. A. A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ROCHA, M. O. C. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease. **PLoS One**, v. 9, p. e87082, 2014.

SOUZA, P. E. A.; ROCHA, M. O. C.; ROCHA-VIEIRA, E.; MENEZES, C. A. S.; CHAVES, A. C. L.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas`disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5283-5291, 2004.

STEINDEL, M., PACHECO, L. K.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; MORAES, M. H.; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T. C. M.; STOCO, P. H.; MURTA, S. M. F.; PINTO, C. J. C.; GRISARD, E. C. Characterization of *T. cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, p. 25-32, 2008.

TAKEHARA, H. A.; MOTA, I. The possible mechanism of action of IgG antibodies and platelets protecting against *Trypanosoma cruzi* infection.

**Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, p. 759-765, 1991.

TAN, J. T.; DUDL, E.; LEROY, E.; MURRAY, R.; SPRENT, J.; WEINBERQ, K.I.; SURH, C. D. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naïve T cells. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 98, p. 8732-8737, 2001.

TEIXEIRA, A. R.; NITZ, N.; GUIMARO, M. C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C. A. Chagas disease. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, p. 788-798, 2006.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; NETO, A. G. F. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: Editora Manole, 2003. 331p.

TZELEPIS, F.; PERSECHINI, P. M.; RODRIGUES, M. M. Modulation of CD4+ T cell-dependent specific cytotoxic CD8+ T cells differentiation and proliferation by the timing of increase in the pathogen load. **PLoS One**, v. 2, p. e393, 2007.

UMEZAWA, E. S.; MILDER, R. V.; ABBRAHAMSOHN, I. A. *Trypanosoma cruzi* amastigotes: development in vitro and infectivity in

vivo of forms isolated from spleen and liver. **Acta Tropica**, v. 42, p. 25-32, 1985.

UYTTENHOVE, C.; SIMPSON, R. J.; VAN SNICK, J. Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 6934-6938, 1988.

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Moléstia de Carlos Chagas” (esquizotripanose humana ou tireoidite parasitária). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 276-293, 1911.

World Health Organization, Control of Chagas Disease, **World Health Organization Technical Report**, WHO, 2015.

WYNN, T. A. Cellular and molecular mechanisms os fibrosis. **Journal of Pathology**, v. 214, p. 199-210, 2008.

WYNN, T. A. Fibrotic disease and the Th1/Th2 paradigm. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 583-594, 2004.

WYNN, T. A.; CHEEVERT, A. W.; JANKOVIC, D.; POINDEXTER, R. W.; CASPAR, P.; LEWIS, F. A.; SHER, A. An IL-12-based vaccination

method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. **Nature**, v. 376, p. 594-596, 1995.

XIAO, B. G.; MA, C. G.; XU, L. Y.; LINK, H.; LU, C. Z. IL-12/IFN-gamma/NO axis plays critical role in development of Th1-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 1191-1196, 2008.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A. CHIARI, E. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends *T. cruzi* TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1051-1054, 2009.

**ANEXO 1**

Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa  
Mônica - Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:[ceua@propp.ufu.br](mailto:ceua@propp.ufu.br);  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

**ANÁLISE FINAL Nº 151/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE  
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 042/13**

Projeto Pesquisa: “Efeito do tratamento com IL-3, IL-7 e/ou IL-9 em camundongos experimentalmente infectados com Trypanosoma cruzi durante a fase aguda da doença”.

Pesquisador Responsável: Claudio Vieira da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

**SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.**

**OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.**

Uberlândia, 29 de Julho de 2013

Prof. Dr. César Augusto Garcia  
Coordenador da CEUA/UFU