

Mariele Cristina Modolo Picka

**Expressão de RNAm para TLR 2, TLR 4 e citocinas em
infecção experimental por cepas de *Trypanosoma
cruzi* de diferentes origens**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Doenças Tropicais da
Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp,
para obtenção do Título de Doutor.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Jussara Marcondes Machado

Botucatu, SP
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO – CAMPUS BOTUCATU – UNESP

Bibliotecária responsável: Rosemeire Aparecida Leite.

Picka, Mariele Cristina Modolo.

Expressão gênica relativa de receptores *toll-like* 2 e 4 e citocinas em infecção experimental por cepas de *Trypanosoma cruzi* de diferentes origens / Mariele Cristina Modolo Picka. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Jussara Marcondes Machado

Capes: 40101096

1. Chagas, Doença de. 2. Doenças transmissíveis. 3. Tripanossoma.

Palavras-chave: Citocinas; Expressão gênica relativa; Infecção experimental; Receptores *toll-like*; *Trypanosoma cruzi*.

Epígrafe

Fenhor, fazei-me instrumento de vossa paz.
Onde houver ódio, que eu leve o amor;
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;
Onde houver discórdia, que eu leve a união;
Onde houver dúvida, que eu leve a fé;
Onde houver erro, que eu leve a verdade;
Onde houver desespero, que eu leve a esperança;
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;
Onde houver trevas, que eu leve a luz.
Ó Mestre, fazei que eu procure mais
consolar, que ser consolado;
Compreender, que ser compreendido;
Amar, que ser amado.
Pois, é dando que se recebe,
é perdoando que se é perdoado,
e é morrendo que se vive para a vida eterna.

São Francisco de Assis

Agradecimentos

*A **Profa. Dra. Jussara Marcondes Machado**, minha orientadora e amiga, quero, primeiramente, agradecer por ter aceitado orientar-me no doutorado. Ela sempre acreditou em meu potencial (na maioria das vezes, mais do que eu mesma) e me incentivou a continuar na vida acadêmica pelo seu exemplo de trabalho, honesto e digno, mesmo nas situações mais difíceis. Agradeço por poder compartilhar minhas alegrias e dificuldades, sempre ouvindo e respeitando minhas sugestões e pelo respeito em nosso convívio. Obrigada por ter me recebido de forma tão profissional e materna. Aprendemos que, na vida, nada tem sentido se não tocarmos o coração das pessoas. Posso dizer que, por sua paciência com meus caprichos, pelo respeito às minhas decisões e pelo carinho em todos os momentos e sem restrições, ela tocou meu coração. Isso é o que dá sentido à vida. Grata por tudo.*

*À minha mãe, **Maria Célia Modolo** e ao meu pai, **Rubens Picka Jr**, sou eternamente grata pela grande paciência, pelo amor especial, por sempre estarem dispostos a me ajudar em qualquer situação. Pela sabedoria em entender, muitas vezes, minha ansiedade e, principalmente, pelo seu apoio que me conforta e me deixa mais forte para superar os desafios da vida. Minha mãe é a lição mais profunda que recebi de amor, princípios e dignidade.*

*À minha irmã querida e amiga, **Milena Cély Modolo Picka**, que sempre me confortou com um olhar de carinho e com palavras doces. Tenho a certeza de que esses gestos me deram forças para seguir em frente. Mi, um beijo de gratidão.*

*Ao meu namorado, **André Aoki Watanabe** que, com seu amor, paciência e constante incentivo, soube compreender minhas ausências. Minha sincera admiração por dedicar, com prazer, parte significativa de seu tempo para compartilhar minhas experiências profissionais e de vida. Agradeço pela alegria de dividir meus dias com ele, por todo o aprendizado nessa caminhada, por todos os sonhos, já vividos e por todos aqueles que ainda lutamos para alcançar.*

*A **Profa. Dra. Célia Regina** por abrir as portas do Laboratório de Clínica Médica – Biologia Molecular e, em especial, a sua aluna, **Dra. Renata Luvizotto**, que me prestou grande auxílio*

no desenvolvimento desta pesquisa, desde a extração do RNA das amostras, até a análise dos dados da PCR em tempo real. Rê, obrigada pelos ensinamentos, oferecidos sempre com carinho, pelo aprendizado e pelas valiosas sugestões, que foram fundamentais para a conclusão da parte prática deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vicente Amato Neto e a Sra Rita Cristina Bezerra, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – USP, pela doação das amostras de T. cruzi, indispensáveis para a realização deste trabalho.

À Larissa Ragoso Oliveira, pela ajuda na realização da curva de parasitemia das cepas de T. cruzi.

Ao Dr. Adeilton Alves Brandão, da Fiocruz-RJ, pela realização da caracterização das cepas de T. cruzi

À Profa. Dra. Simone Baldini, com quem aprendi muito durante o seu doutorado, e por estar sempre disposta a ajudar.

Ao Prof. Dr. João Pessoa, por me receber prontamente em seu Laboratório e pela orientação na escolha dos primers.

Ao Prof. Dr. Domingos Alves Meira, pelo exemplo de vida.

Ao curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e à secretária Solange Sako, pela amizade que sempre me dedicou.

A Dra Maria Aparecida Mourão Brasil, pela ajuda na etapa da elaboração do projeto de pesquisa e também na orientação da análise estatística.

Ao Laboratório de Pesquisa de Doenças Tropicais e a todos os alunos que por lá passaram, em especial a Daniela Moris, Eliana e Larissa e a seus funcionários, Carlos Roberto Gonçalves Lima e Dra. Sueli.

*Aos **docentes e funcionários do Depto de Doenças Tropicais**, por sempre me acolherem com carinho.*

*Aos **funcionários da Seção de Pós-graduação**, pela atenção e pelo auxílio durante esses anos.*

*À **Sra. Luciana Pizzani**, da Biblioteca, pela revisão e correção das referências.*

*À toda **minha família**, em especial, meus avós, pelos exemplos deixados.*

*Ao meu **Amigo Dr. Celso Charuri** (in memorian), meu reconhecimento por ser eterno mestre das lições de amar. Ele me mostrou a existência de um Mundo Bem Melhor.*

*Por último, embora com igual importância, agradeço aos meus **Amigos** que, tenho certeza, sempre torceram por mim.*

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
2. Objetivos.....	09
3. Material e Métodos.....	10
4. Resultados.....	23
5. Discussão.....	44
6. Conclusões.....	54
Resumo.....	55
Abstract.....	57
Referências.....	59
Apêndices	
Anexos	

1. INTRODUÇÃO

A DCh (doença de Chagas), causada pelo protozoário flagelado *T. cruzi* (*Trypanosoma cruzi*), tem prevalência estimada de 18 milhões de casos, nos 15 países das Américas em que é endêmica ^{1,2}. Dados da Organização Pan Americana de Saúde revelam que cerca de 109 milhões de indivíduos estão expostos ao risco de infecção e aproximadamente 7,7 milhões de pessoas foram infectadas em 2005 ^{3,4}. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, em 2008, mais de 10 000 pessoas morreram com a DCh ⁵.

No Brasil, a DCh se distribui por 3,5 milhões de quilômetros quadrados, nos estados do Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, com cerca de cinco milhões de infectados. No entanto, somente em algumas regiões, a DCh assume o papel de importante endemia ^{6,7}. Em decorrência de migrações populacionais, a DCh, classicamente considerada uma enfermidade rural, passou a atingir centros urbanos, estimando-se que, aproximadamente, 300.000 indivíduos infectados residam no estado de São Paulo e 200.000, no Rio de Janeiro ^{1,2}.

Além da transmissão natural, pelas fezes contaminadas de triatomíneos vetores, depositadas no local do repasto sangüíneo, existem outras modalidades de transmissão, como transfusional, congênita, por transplante de órgãos e tecidos de pacientes infectados, ingestão de alimentos contaminados, aleitamento materno e acidente em laboratório ^{7,8,9}.

A doença pode ser aguda ou crônica, de acordo com a alta ou baixa intensidade de elementos mórbidos e sua persistência nos indivíduos infectados. Na fase aguda, em que o *T. cruzi* pode ser encontrado em quase todos os órgãos e tecidos, podem ocorrer sinais e sintomas, mas, em geral, esta fase é assintomática,

ou oligossintomática ¹⁰. Nessa fase, a imunidade tenta isolar o tripomastigota, forma circulante flagelada, extracelular, do *T. cruzi*, a fim de evitar que se dissemine. A resposta imune controla a parasitemia no final da fase aguda, mas um pequeno número de parasitas ainda persiste nos tecidos. O parasita, então, adota a forma amastigota, aflagelada e intracelular, para se preservar ¹¹. A ineficiência dos mecanismos imunes para eliminar o *T. cruzi* garante sua persistência no organismo, e o indivíduo evolui para a fase crônica da DCh ¹². Aproximadamente 50% dos indivíduos na fase crônica da doença têm a forma indeterminada, caracterizada, apenas, por sorologia positiva. Por outro lado, podem ocorrer danos nos tecidos durante essa fase, havendo, como consequência, o aparecimento das formas cardíaca e digestiva da doença ^{10,12}.

Não existe, até o momento, um marcador que determine se o indivíduo irá ou não evoluir para as formas clínicas da doença, porém, muitos dos sinais e sintomas observados são consequência da resposta imune do hospedeiro contra o parasita ¹¹.

Na relação do *T. cruzi* com o hospedeiro, a imunidade inata é fundamental nas fases de reconhecimento do não próprio e na indução da imunidade adquirida. Após a infecção, componentes do *T. cruzi*, incluindo seu DNA e glicoconjugados, ativam a imunidade inata via TLR (receptores *toll-like*) presentes em macrófagos e células dendríticas ¹³. A partir do contato com o microorganismo invasor, esses receptores transmitem o estímulo recebido para a MyD88, molécula protéica adaptadora dos TLRs, capaz de ativar genes pró-inflamatórios e co-estimulatórios ^{14,15}. Assim, a sinalização da MyD88 pode estar envolvida no encaminhamento inicial das células T CD4+ virgens para diferenciação em Th1 ou Th2 ¹⁶.

A participação dos TLRs é fundamental, pois promove o recrutamento de fagócitos para tecidos infectados, controlando a replicação dos parasitas, antes do estabelecimento da imunidade específica. Entretanto, quando ativados em excesso, os TLRs estimulam quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , responsáveis pela patogênese da DCh ^{17,18}.

Em células de mamíferos, a família dos TLR é composta por 10 membros e são agrupados de acordo com o tipo de ligantes que reconhecem: TLR 2 e TLR 4, por exemplo, reconhecem estruturas com base lipídica ^{19,10}. Essas estruturas são chamadas de PAMPS (padrões moleculares associados à patógenos) e, após seu reconhecimento pelos TLRs, ocorre o controle da atividade da resposta imune inata e a modulação da resposta adaptativa, com a liberação de citocinas ²⁰. Os PAMPS são representados por LPS de bactérias Gram-negativas, ácido lipoteicoico e peptidoglicano de bactérias gram-positivas, lipopeptídeos bacterianos e outros componentes da parede celular microbiana e são essenciais para a sobrevivência desses patógenos ^{20,21,22,23}. Células macrofágicas, expostas a esses componentes microbianos, sintetizam altos níveis de IL-12 e TNF- α , induzindo a síntese do IFN- γ . Exemplos de PAMPS, os lipopetídeos de bactérias e os GPILs (glicoinositolfosfolipídes) de parasitas são reconhecidos pelos TLR 2, que, uma vez ativados, irão induzir a resposta imune ^{20,24}.

Grandes quantidades de GPILs são encontradas na superfície dos tripanossomatídeos, seja como GPI (glicosilfosfatidilinositol), que ancora glicoproteínas e polissacarídeos, seja como GPILs livres. Estes últimos, apesar de terem estrutura nuclear idêntica à do GPI, não ancoram proteínas e têm um núcleo glicano cujos resíduos de galactofuranose parecem ser altamente imunogênicos ^{25,26,27}. No *T. cruzi*, GPI-mucina (GPI ancorando mucina) e GPILs recobrem uma

extensão de 60% a 80% da membrana do parasita e são reconhecidos pelo TLR 2^{28,29}. A GPI-mucina de tripomastigotas de *T. cruzi* é essencial para o início de várias funções macrofágicas, como, por exemplo, a produção de citocinas e NO, dependente do TLR 2^{17,24,30,31}.

Campos et al.¹⁷ observaram que, no pico da parasitemia na infecção pelo *T. cruzi*, camundongos TLR 2-/- apresentaram carga parasitária mais alta e mortalidade ligeiramente maior que os animais normais infectados. Níveis elevados de IFN- γ , IL-12 e NO foram produzidos pelas células esplênicas desses animais enquanto que, no soro, havia aumento de IFN- γ , mas, não, de IL-12. Os autores também verificaram que camundongos deficientes em MyD88 não produziram TNF- α , IL-12 e NO, sob estímulo quer de GPI-mucina, quer de parasitas inteiros¹⁷.

Esses relatos fornecem fortes evidências da relação dos TLRs com a resposta imune inata contra o *T. cruzi* e da necessidade da presença da molécula de MyD88 para a ativação dessa resposta^{17,24}. Robert et al.³² sugeriram que o TLR 2 pode ter papel imuno-regulatório, predominante durante a fase aguda de infecção e, também, o envolvimento de um outro membro dos TLRs na resposta inflamatória ao parasita.

Oliveira et al.³³ relataram que molécula de GIPL induziu resposta pró-inflamatória dependente da expressão de TLR 4. Portanto, PAMPS de *T. cruzi* são reconhecidos por TLR 2 e TLR 4.

Dabbagh et al.³⁴ observaram que camundongos TLR 4-/- desenvolveram resposta Th2 mais atenuada que a de animais normais, resultado em parte atribuído à incapacidade de maturação das células dendríticas, na ausência daqueles receptores. Os autores notaram menor produção de IL-4 e IL-5 por células T CD4+ após estímulo, mesmo que continuado, com células dendríticas

TLR 4/-³⁴. Mastócitos também expressam TLR 2 e TLR 4 e respondem à exposição de ligantes desses receptores com produção de citocinas do perfil Th2³⁵.

Dessa forma, pode-se dizer que os TLRs são importantes no estabelecimento da imunidade adquirida ou adaptativa, celular ou humoral, contribuindo para determinar a diferenciação de células Th tanto em células Th1, quanto em Th2³⁶.

Durante a fase aguda da infecção chagásica, macrófagos, células NK, T CD4+ e T CD8+ são altamente ativados^{37,38,39,40}. Tripomastigotas e amastigotas do parasita podem induzir a síntese de IL-12 e de outras citocinas por macrófagos^{30,41,42}. A resposta Th1, que se segue, caracteriza-se pela produção de IFN- γ , por linfócitos T, com conseqüente aumento da atividade antiparasitária do macrófago contra o *T. cruzi*^{43,44,45}. Animais tratados com anti-IFN- γ apresentam-se mais susceptíveis à infecção pelo parasita, enquanto aqueles que recebem IFN- γ tornam-se mais resistentes^{46,47,48}. Michailowsky et al.⁴⁹ demonstraram ação sinérgica do IFN- γ com o tratamento antiparasitário, na fase aguda da infecção. No entanto, essa citocina também tem sido relacionada ao desenvolvimento de cardiopatia na fase crônica, o que sugere que tenha um duplo papel na DCh⁵⁰.

O TNF- α é outra citocina pró-inflamatória com papel destacado na modulação da resposta imune de resistência à infecção pelo *T. cruzi*^{51,52}. Essa substância atua no controle o crescimento dos parasitas, por promover a ativação das células fagocitárias⁵³.

Assim como a IL-12 e o IFN- γ participam da diferenciação em resposta Th1, reduzindo a carga parasitária na fase crônica da infecção, a IL-4 e a IL-10 levam à resposta Th2, indutora de imunidade humoral⁵⁴. O aumento de secreção de IL-10,

durante a fase crônica, pode estar associado à proteção do hospedeiro contra resposta inflamatória intensa, induzida pelo perfil Th1. Essa citocina é produzida pelos macrófagos e regula a expressão ou função de IL-12 e IFN- γ ^{55,56}. Dutra et al. ⁵⁷ detectaram níveis mais altos de IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- γ em pacientes chagásicos crônicos em relação a indivíduos não infectados, sugerindo que o equilíbrio entre essas citocinas pode ser o ponto principal do controle da morbidade, durante a fase crônica da infecção.

Em resumo, a resistência de um organismo às infecções requer a geração de uma resposta imune que, não só, controle o patógeno invasor, mas, também, que limite os danos colaterais aos tecidos do próprio hospedeiro, resultantes dessa resposta ⁵⁸. Assim, ao mesmo tempo em que os elementos efetores agem no sentido de eliminar o parasita, mecanismos reguladores são ativados, minimizando a lesão tecidual provocada pela própria resposta imune ^{58,59}. Participam dessa regulação, tanto componentes da imunidade inata, quanto da adquirida ⁶⁰.

Existem vários tipos de células reguladoras, algumas ditas reguladoras naturais e outras induzidas durante a resposta contra as infecções ⁶¹. São chamadas de T reguladoras e são uma subpopulação de células T (TCD4⁺CD25⁺) que têm a finalidade de regular a resposta imune, tendo a capacidade de controlar as respostas excessivas ou prejudiciais a patógenos ou antígenos próprios, minimizando o desenvolvimento de imunopatologia nos hospedeiros ^{62,63,64}.

Uma nova linhagem de linfócitos T *helper* CD4⁺ efetores, chamada células Th17, que produzem IL-17A e F, IL-21, IL-22 e TNF- α , vem sendo considerada ⁶⁵. Guedes et al. ⁶⁶ mostram que a IL-17 é produzida durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* e controla a inflamação cardíaca pela modulação da produção de IFN- γ , IL-12 e TNF- α .

Quanto à imunidade humoral, a ativação dos linfócitos B, dependente de perfil Th2, contribui para a redução da parasitemia e eliminação das formas sanguíneas^{67,68}.

Trabalhos revelam que características morfológicas, biológicas, imunológicas e moleculares distintas do *T. cruzi* podem, também, influenciar a resposta imune do hospedeiro^{69,70,71,72}. Vários autores, estudando a porção do DNA que codifica o gene 24 S rRNA ribossomal e a sequência do gene mini-exon de cepas e clones de *T. cruzi*, de diversas regiões do continente americano, propuseram uma classificação do parasita em dois grupos: TCI, cepas que predominam no ambiente silvestre e TCII, as que predominam no ambiente doméstico^{73,74,75,76}. Essa classificação foi feita pela análise de micro-satélite de 53 populações monoclonais do *T. cruzi*, que demonstraram grande polimorfismo genético^{77,78}. O TCI é um único grupo, relativamente homogêneo, e está associado ao zimodema 1, ao contrario do TCII, que está relacionado com o zimodema 2 e cuja população pode ser mais complexa, sendo subdividida em cinco subgrupos: TCIIa e TCIIc: linhagens híbridas – subgrupos zimodemas 3B e 3A; TCIIb e TCIIe: ambiente antroponotico do Brasil, Chile, Bolívia e Argentina; TCIIId: ambiente silvestre da Amazônia, Nordeste do Brasil, Paraguai e Argentina^{76,79,80,81,82,83}.

Assim, pode-se dizer que tanto características do hospedeiro, como do parasita, podem influenciar o curso da infecção pelo *T. cruzi*, bem como a patogênese da DCh. Para o controle da infecção chagásica, vários componentes da resposta imune, inata e adquirida, celular e humoral, são induzidos, simultaneamente, por mecanismos ainda não completamente esclarecidos. O estudo de TLRs pode fornecer melhor compreensão dos mecanismos que deflagram a resposta imune adaptativa, com vista à eliminação do agente

infeccioso, assim como dos eventos patogênicos da fase crônica, determinados por essa resposta imune. Enfim, há ainda muito a fazer para que se tenha maior conhecimento da patogenia da DCh, que permita melhor abordagem daqueles que sofrem desta doença, que é uma entre as mais negligenciadas do Brasil.

2. OBJETIVOS

1. Fazer a caracterização molecular das três cepas de *T. cruzi* a serem utilizadas na infecção dos animais.
- 2 - Definir os momentos da verificação da expressão gênica relativa das variáveis estudadas - TLR 2, TLR 4, IL-12p40, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10, de acordo com as fase evolutivas da infecção dos animais pelas três cepas.
2. Verificar a expressão gênica relativa do TLR 2 e TLR 4 nos animais infectados com as três cepas de *T. cruzi*, nos momentos definidos no item 2.
3. Verificar a expressão gênica relativa de IL-12 p40, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 nos animais infectados com as cepas de *T. cruzi*, nos momentos definidos no item 2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c, machos, entre oito e 12 semanas de vida, criados e mantidos no Biotério do Laboratório de Pesquisa da Área de Doenças Tropicais, do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, da Faculdade de Medicina de Botucatu. Esses animais, com peso aproximado de 30g, foram mantidos à temperatura de 25°C - 27 °C, com ciclos claro/escuro de 12 em 12 horas, com alimentação e água *ad libitum*. O Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, aprovou o projeto em 29 de novembro de 2006 e a alteração do título, em 8 de novembro de 2010. (Anexos 1 e 2)

3.2. Cepas de *T. cruzi*

Foram utilizadas três cepas de *T. cruzi*: ZMC e JLP, isoladas de pacientes chagásicos crônicos, atendidos no Instituto do Coração – FMUSP e a cepa Y do protozoário. As três cepas foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Vicente Amato Neto, do Instituto de Medicina Tropical - USP, em meio de hemocultura LIT (*liver infusion tryptose*) (Anexo 3). Os parasitas foram mantidos por passagens intraperitoneais seriadas, em camundongos BALB/c, no Laboratório de Pesquisa da Área de Doenças Tropicais, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

Foi realizada uma PCR convencional para identificar as amostras como sendo do *T. cruzi* (Figura 1). Para isso, foram obtidas amostras de sangue, por

punção cardíaca, de camundongos infectados com as três cepas, para a extração de DNA. Utilizou-se o *kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification (Amersham Biosciences)*, segundo recomendações do fabricante. Os *primers* utilizados foram S35 e S36, que permitiram a amplificação de uma região com 330 pb de comprimento, específica de minicírculo de kDNA de *T. cruzi*, de acordo com a técnica descrita por Picka et al.⁸⁴

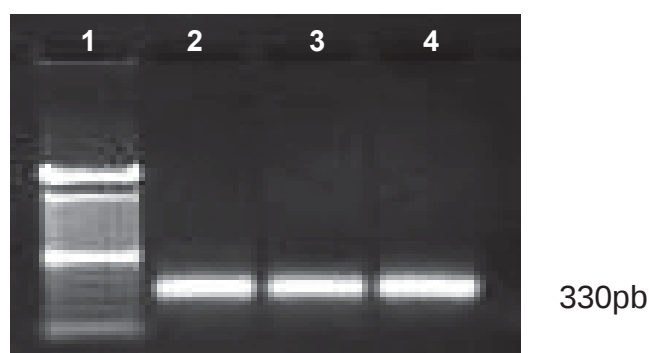


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose das cepas ZMC e JLP, isoladas de pacientes com infecção chagásica e da cepa Y de *T. cruzi*. As bandas apresentam 330 pb (1: marcador de peso molecular/Ladder 100pb; 2: cepa ZMC; 3: cepa JLP; 4: cepa Y).

3.3. Caracterização molecular das cepas

A caracterização molecular das cepas Y, ZMC e JLP foi realizada de acordo com a técnica da PCR *multiplex*, descrita por Fernandes et al.⁸⁵, que permitiu classificá-las em dois grupos: TC I e TC II. Para isso, formas epimastigotas foram obtidas pelo crescimento do parasita em meio LIT e a extração do DNA foi realizada pelo *kit illustra™ blood genomicPrep Mini Spin (GE Healthcare)*.

Para obter a amplificação de parte do espaçador não transcrito do gene de mini-exon, foram utilizados como *primers* os oligonucleotídeos: 5'-TTG CTC GCA CAC TCG GCT GCA T-3', 3'-AAC GTG CGT GTG AGC CGA CGT A-5' (TC I); 5'-

ACA CTT TCT GTG GCG CTG ATC G-3', 3'-TGT GAA AGA CAC CGC GAC TAG C-5' (TC II).

A reação continha 25pmol de cada *primer*, tampão 1x (Tris-HCL pH 8,3, 25 mM KCL, 0,1mg/ml de soroalbumina bovina), 1,5mM de MgCl₂, 2,5 Unidades de Amplitaq Gold™ DNA Polimerase (Cetus, Perkin Elmer), 0,6μM de dNTP mix e 10 – 50ng de DNA genômico.

As condições de amplificação da PCR foram:

Temperatura °C	Tempo	Número de Ciclos
95	5 min	1
94	30 seg	35
55	30 seg	
72	30 seg	
72	10 min	1
4	∞	

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, em TBE 0,5X, com um marcador de peso molecular de 100pb e corado com brometo de etídio. A amplificação de 200pb está relacionada ao TCI e de 250pb ao TCII.

A caracterização molecular foi feita com a colaboração do Dr. Adeilton Alves Brandão, e realizada no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa Médica do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro – RJ.

3.4. Definição dos momentos da evolução da infecção pelas três cepas de *T. cruzi*

Os momentos de determinação das expressões gênicas relativas dos TLRs e das citocinas foram pré-estabelecidos, de acordo com uma curva evolutiva de parasitemia e de sobrevida realizada com os animais infectados pelas cepas Y, ZMC e JLP de *T. cruzi*. Para isso, foram utilizados 30 camundongos BALB/c, sendo 10 para cada uma das cepas. Esses animais foram inoculados pela via intraperitoneal, com o inóculo de 1×10^4 tripanossomas/animal, obtido por punção cardíaca de animais previamente infectados com as cepas de *T. cruzi*. Para a contagem dos parasitas, foram examinados ao microscópio óptico 5 μ l de sangue, obtidos da cauda dos camundongos infectados, seguindo a técnica de Brener⁸⁶. As curvas de parasitemia foram feitas utilizando a média aritmética das contagens de tripomastigotas sangüíneos de 10 camundongos para cada cepa, em dias alternados, até a estabilização da parasitemia. Para a realização da curva de sobrevida foi feita a inspeção diária das gaiolas dos animais infectados com as cepas Y, ZMC e JLP de *T. cruzi* e observado a mortalidade dos animais.

3.5. Grupos experimentais

Foram utilizados 54 camundongos, assim distribuídos:

G1: 18 camundongos machos BALB/c infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.

G2: 18 camundongos machos BALB/c infectados com a cepa ZMC de *T. cruzi*.

G3: 18 camundongos machos BALB/c infectados com a cepa JLP de *T. cruzi*

A infecção dos camundongos BALB/c de G1, G2 e G3 foi feita pela inoculação intraperitoneal de 1×10^4 tripanossomas/animal, obtidos por punção cardíaca de animais previamente infectados. O exame direto de 5µl de sangue caudal, entre lâmina e lamínula, após alguns dias de infecção, confirmou a infecção dos animais.

3.6. Sacrifício e retirada do baço dos animais

De acordo com a curva parasitêmica e de sobrevida, previamente realizada, os momentos de sacrifício dos animais de G1, G2 e G3 foram os seguintes: M1 - 24 horas após a infecção; M2 - início da fase aguda; M3 - pico máximo de parasitemia - fase aguda; M4 - momento da queda importante e de manutenção da parasitemia - início da fase crônica; M5 - momento final, determinado pela curva de sobrevida dos animais infectados pelas cepas Y, ZMC e JLP. Os valores das variáveis estudadas, encontrados na fase pré-infecção dos animais (M0), foram tomados como controles de normalidade.

Para cada momento pré-definido (M0 a M5), foram sacrificados três camundongos por grupo, pela utilização de anestésico em dose excessiva (hipnol 4%). Os baços dos animais foram removidos e guardados em tubos, livres de DNA e RNA, com o reagente *RNA Safer Stabilizer* (Omega™), para preservação do material e, posteriormente, mantidos em *freezer* -80°C, até o momento de uso.

3.7. Extração de RNA

O RNA total foi extraído das células esplênicas dos camundongos de G1, G2 e G3 nos momentos pré-definidos (M0 a M5). Aproximadamente 100mg do baço de cada animal foram usados para a extração. Os tubos e ponteiros utilizados eram livres de contaminação por DNA e RNA. Amostras de baços, ainda congelados, foram colocadas em tubo com 1ml de trizol e rompidas por um homogeneizador (*Polytron*). Entre uma amostra e outra, houve limpeza do homogeneizador com água *DEPC-Diethyl Pyrocarbonate* (*Sigma-Alchich*) e água *RNase Away* (Invitrogen). Foram acrescentados 200µl de clorofórmio na solução obtida, que foram misturados em agitador, por 15 segundos. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por três minutos e centrifugados, por 15 minutos, a 14.000rpm, a 4°C. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo, com 500µl de álcool isopropílico. Houve inversão dos tubos e incubação à temperatura ambiente, por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 14.000rpm e 4°C para a formação de um *pellet* no fundo do tubo. Todo o líquido foi desprezado sendo, então, adicionado 1ml de etanol 75%. A solução foi misturada em agitador, até a liberação do *pellet* da parede do tubo e, em seguida, centrifugada por cinco minutos, a 12000 rpm a 4°C. Novamente, o líquido foi desprezado e o tubo seco. O *pellet* foi ressuspenso em 100µl de água ultra pura e colocado a 60° C por 10 minutos. As amostras foram tratadas com DNase (Promega), seguindo orientações do fabricante. Posteriormente, as mesmas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, para verificar a existência de contaminação com DNA, bem como a integridade do RNA extraído, que foi constatada pela presença das bandas 28s, 18s e 5s/5.8s rRNA (Figura 2).

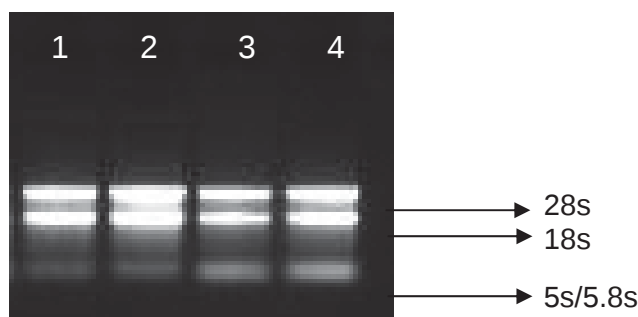


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 1% do RNA extraído de células esplênicas de camundongos infectados com as cepas Y, ZMC e JLP de *T. cruzi*. As bandas amplificadas representam as regiões 28s, 18s e 5s/5.8s do rRNA. (1 e 2: RNA da cepa Y; 3: RNA da cepa JLP; 4: RNA da cepa ZMC).

As amostras de RNA foram mantidas em *freezer* - 80°C até o momento de uso. Essa etapa foi realizada no Laboratório Experimental de Clínica Médica – Biologia Molecular, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

As concentrações e a integridade do RNA foram determinadas a partir dos valores da absorbância de 260nm, dados pelo aparelho *NanoDrop® ND Spectrophotometer*, do Laboratório de Biologia Molecular da Divisão Técnica do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Todas as amostras tiveram valor de absorção de aproximadamente 2.0.

3.8. Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de 1µg de RNA total, pelo kit *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Para cada 1µg de RNA total foi utilizado 1µl de *random primer* (50-250ng) (Invitrogen), 1µl de 10mM Mix dNTP (Invitrogen) e 13µl q.s.p. de água destilada e esterilizada. A mistura foi homogeneizada,

rapidamente centrifugada e aquecida a 65°C por 5 minutos. Para cada amostra, foram adicionados 4µl de *5X First-Strand Buffer* (Invitrogen), 1µl de 0.1M DTT (Invitrogen), 1µl de *RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor* (Invitrogen) e 1µl de *SuperScript™ III RT*. A solução foi homogeneizada, rapidamente centrifugada e incubada nas seguintes condições da reação: 25°C por 5 minutos, 50°C por 50 minutos e 70° por 15 minutos. Para remover o RNA complementar do cDNA, foi adicionado 1µl (2 unidades) de *E. coli RNase H*. O cDNA foi novamente incubado a 37°C por 20 minutos.

Foi sintetizada, em uma única vez, a quantidade suficiente de cDNA para a realização de todo o experimento. As amostras foram mantidas em *freezer* - 80°C, até a utilização na PCR em tempo real.

3.9. Padronização da técnica da PCR em tempo real

A quantificação relativa dos genes foi feita pelo método C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$)⁸⁷. Esse cálculo somente pode ser usado se as eficiências de amplificação dos genes alvo e controle apresentarem valores muito próximos. A fim de comprovar a eficiência da reação, os genes de cada TLR e citocinas e o gene controle da β -actina foram amplificados, em diluições seriadas (pura, 1:2, 1:4, 1:8), em duplicata. As reações utilizaram o *Power Sybr-Green (Applied Biosystems)* para a amplificação das amostras. Isso resultou em variações no valor de C_t (*Threshold cycle* - números de ciclos necessários para atingir o limiar de detecção), visto que, quanto mais diluída a amostra, mais tardiamente aparece a amplificação. A partir do valor de C_t de cada uma das diluições, foi possível realizar o cálculo da eficiência de cada *primer* baseado na inclinação (*slope*) encontrada na reta feita

pelo software *Step One Plus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems)*. O valor do *slope* foi inserido na fórmula a seguir:

$$E=10^{(-1/\text{slope})}-1$$

Eficiência (E) de 100% resulta em curva padrão com *slope* de -3,3. O coeficiente de correlação (R^2) mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de Ct das amostras padrão. O valor de $R^2 = 1$ indica um ajuste perfeito entre a regressão linear e os dados individuais. As características dos genes analisados foram:

GENES	<i>slope</i>	Eficiência	R^2
TLR 2	-3,36	98%	0,98
TLR 4	-3,30	100%	0,99
IL-12 p40	-3,34	99%	0,95
IFN- γ	-3,39	96%	0,96
TNF- α	-3,38	97%	0,97
IL-4	-3,34	99%	0,98
IL-10	-3,38	97%	0,97
β -Actin	-3,31	100%	0,98

Todos os genes foram considerados dentro do padrão de eficiência aceitável, com *slope* variando entre -3,30 e -3,39.

Todas as reações foram finalizadas com a curva de dissociação *melting*, realizada para verificar a especificidade da amplificação e confirmar a ausência de formação de dímeros de *primer* ou de qualquer outro produto inespecífico. Nenhum gene apresentou irregularidades nesta etapa.

As seqüências de cada um dos *primers* utilizados para TLRs, citocinas e β -actina estão indicadas a seguir:

genes	<i>primers</i>	seqüências
TLR 2	Direto R	5`- TTC GAT GGA ATC GAT GAT GTT - 3`
	Indireto F	5`- TGT CTC CAC AAG CGG GAC TT-3`
TLR 4	Direto R	5`- TCT CCA CAG CCA CCA GAT TCT - 3`
	Indireto F	5`- TGA CAG GAA ACC CTA TCC AGA GTT-3`
IL-12 p40	Direto R	5`-GAA GTT CAA CAT CAA GAG CAG TAG -3`
	Indireto F	5`-AGG GAG AAG TAG GAA TGG GG -3`
IFN- γ	Direto R	5`- ACA ACG CTA TGC AGC TTG TTC GTG -3`
	Indireto F	5`- AGA GGA TGG TTT GCA TCT GGG TCA -3`
TNF- α	Direto R	5`-CCT ACG GGA AGA GTC TGG AAA GG -3`
	Indireto F	5`-AAG GGA GAG TGG TCA GGT T -3`
IL-4	Direto R	5`- AAT ATG CGA AGC ACC TTG GAA GCC -3`
	Indireto F	5`- AGA TGG ATG TGC CAA ACG TCC TCA -3`
IL-10	Direto R	5`-AGT GTG AAA TCA GTG CCT GAC CCA -3`
	Indireto F	5`-GCC AAT CTC CAA GGC GCC TAA TTT -3`
β -Actina	Direto R	5`-TGC CTG GGT ACA TGG TGG TA-3`
	Indireto F	5`-AAG TGT GAC GTT GAC ATC CGT AA-3`

3.10. PCR em tempo real

A análise da amplificação gênica foi realizada pela PCR em tempo real, pelo método da quantificação relativa ($\Delta\Delta C_T$). Para isso, foi avaliada a relação do C_t obtido nos animais de G1, G2 e G3, de M1 a M5, em relação ao C_t de animais não infectados, M0.

Para tanto, foi efetuada a amplificação dos genes dos receptores TLR 2 e TLR 4 e das citocinas IL-12 p40, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10, de acordo com o protocolo da *Applied Biosystems Power Sybr – Green*, no termociclador *Step One Plus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems)* do Laboratório Experimental de Clínica Médica – Biologia Molecular, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

O volume total da reação, de 20 μ l para cada amostra, foi composto de: 1,5 μ l de cDNA, 10 μ l *Syber- Green*, H₂O DEPC q.s.p. e 0,5 μ l de cada *primer* (10 pmol).

O protocolo de amplificação no termociclador foi programado para realizar 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de anelamento, a 95°C por 15 segundos e extensão a 60°, por um minuto. O estudo do gene (*melt curve*) foi realizado com desnaturação 95°C, por 15 segundos, anelamento 60°C, por 1 minuto e extensão a 95°C, por 15 segundos.

Foi realizada, também, a amplificação do gene da β -actina, visto que o valor real de expressão gênica foi obtido pela comparação do resultado da amplificação dos genes de interesse com esse gene constitutivo. Esse controle endógeno corrige variações relacionadas à quantidade de tecido utilizado na extração, à eficiência da extração do RNA e da transcrição reversa, à amplificação,

à quantificação, à pipetagem e à degradação do RNA. A *melting curve* também foi feita em todas as amostras, para verificar o quanto cada uma delas foi capaz de se expressar e, ainda, se houve contaminantes, pela presença de picos de amplificação. As amostras dos camundongos antes da infecção, em M0, também foram amplificadas para todos os genes.

Ao final da reação, todas as curvas de amplificação foram analisadas e os resultados da PCR em tempo real expressos em valores de Cts. Esses valores geraram resultados relativos e foram expressos em ordem de grandeza.

Para cada grupo (G1, G2 e G3), foram analisadas, em duplicata, amostras de três animais, de cada momento (M0-M5) pela PCR em tempo real. Os valores foram obtidos em números de Ct e a média de cada momento foi calculada com os valores da duplicata em cada animal (n=3). Tal procedimento foi realizado para os animais de G1, G2 e G3. A partir das médias encontradas, foi calculado o valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que:

$$\Delta Ct = Ct_{(alvo)} - Ct_{(\beta\text{-actina})}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(amostra)} - \Delta Ct_{(calibrador/n\tilde{a}o\text{ infectado})}$$

$$\text{Quantidade relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Os resultados foram expressos em aumento ou diminuição da expressão gênica. Os valores de cada momento pós-infecção (M1-M5) foram normalizados pela expressão da β -Actina em cada amostra e comparados aos da pré-infecção (M0).

3.11. Análise estatística

Foi utilizada análise em esquema fatorial com medidas repetidas, considerando cepa e momentos como efeitos principais e a interação cepa x momento.

Quando a interação cepa x momento foi significativa, foi realizada a decomposição em efeitos alinhados, fixando cepa e variando momentos e vice-versa. A composição múltipla foi feita pelo teste de *Tukey* ajustado.

O nível de significância foi fixado em 5%. Todas as análises foram feitas utilizando o programa *SAS for Windows v.9.2*.

4 – RESULTADOS

Os resultados da caracterização molecular, dos momentos da evolução da infecção e das expressões gênicas relativas do RNAm do TLR 2 , TLR 4, IL-12 p40, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10, dos três grupos de camundongos G1 (Y), G2 (ZMC) e G3 (JLP), serão apresentados a seguir.

4.1. Caracterização molecular das cepas

As cepas do *T. cruzi* utilizadas neste estudo (Y, ZMC e JLP) foram investigadas para demonstrar se eram pertencentes ao ambiente silvestre (TCI), ou doméstico (TCII). Pela metodologia utilizada, cepas que geram produtos com 200pb são caracterizadas como pertencentes ao TCI e as que geram produtos com 250 pb, ao TCII. Como as três cepas do estudo geraram fragmentos com 250pb, foram classificadas como TCII, pertencentes, portanto, ao ciclo doméstico (Figura 3).

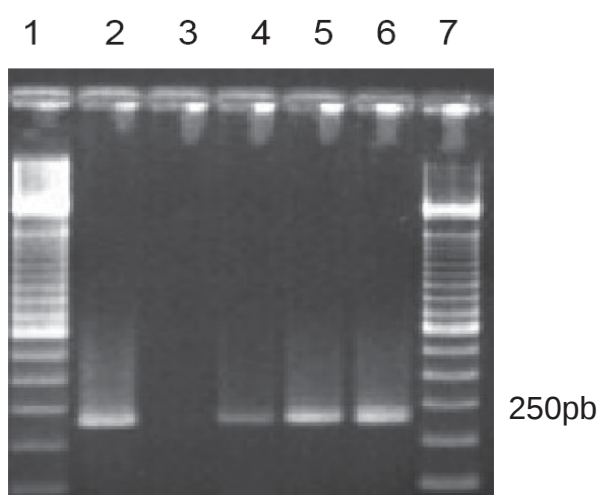


Figura 3. Produto da amplificação do gene mini-exon de amostras de DNA de G1, G2 e G3. 1- marcador de peso molecular/Ladder; 2 – controle positivo de *T. cruzi II*; 3- controle negativo; 4- cepa Y; 5- cepa ZMC; 6- cepa JLP; 7- marcador de peso molecular/Ladder 100pb.

4.2. Momentos de evolução da infecção pelas três cepas de *T. cruzi*

As curvas de parasitemia e sobrevida estão representadas nas Figuras 4 e 5. A realização das curvas permitiu definir as fases aguda, com alta parasitemia, e crônica, com parasitemia baixa, porém persistente, nos animais infectados pelas cepas Y, ZMC e JLP de *T. cruzi*. Permitiu, também, que fossem indicados os momentos da determinação das expressões gênicas das citocinas e dos TLRs e que se conhecesse o comportamento de cada uma das cepas. Os animais infectados com as três cepas apresentaram comportamentos distintos em relação à quantidade de parasita, momento do pico da fase aguda e de mortalidade. Pelos resultados obtidos, animais infectados com a cepa Y apresentaram maior parasitemia, fase aguda e mortalidade mais precoces do que os infectados com as outras duas cepas. As cepas ZMC e JLP apresentaram, ainda, comportamento diferente entre si, sendo que animais infectados com a JLP apresentaram menor parasitemia, fase aguda mais precoce e queda importante do número de parasitas sangüíneos mais rápida do que o observado nos animais com a cepa ZMC. (Apêndice 1).

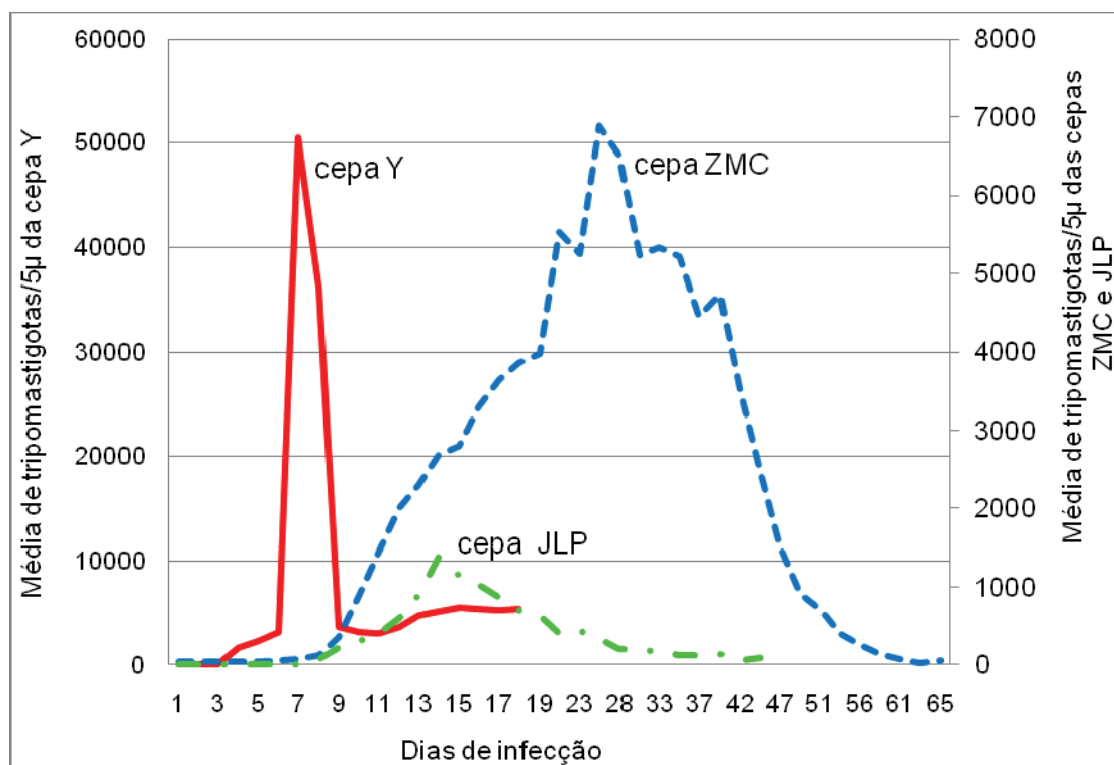


Figura 4. Evolução da parasitemia (média de 10 animais) em camundongos BALB/c inoculados via intraperitoneal com 1×10^4 tripomastigotas/ animal da **cepa Y** de *T. cruzi*.

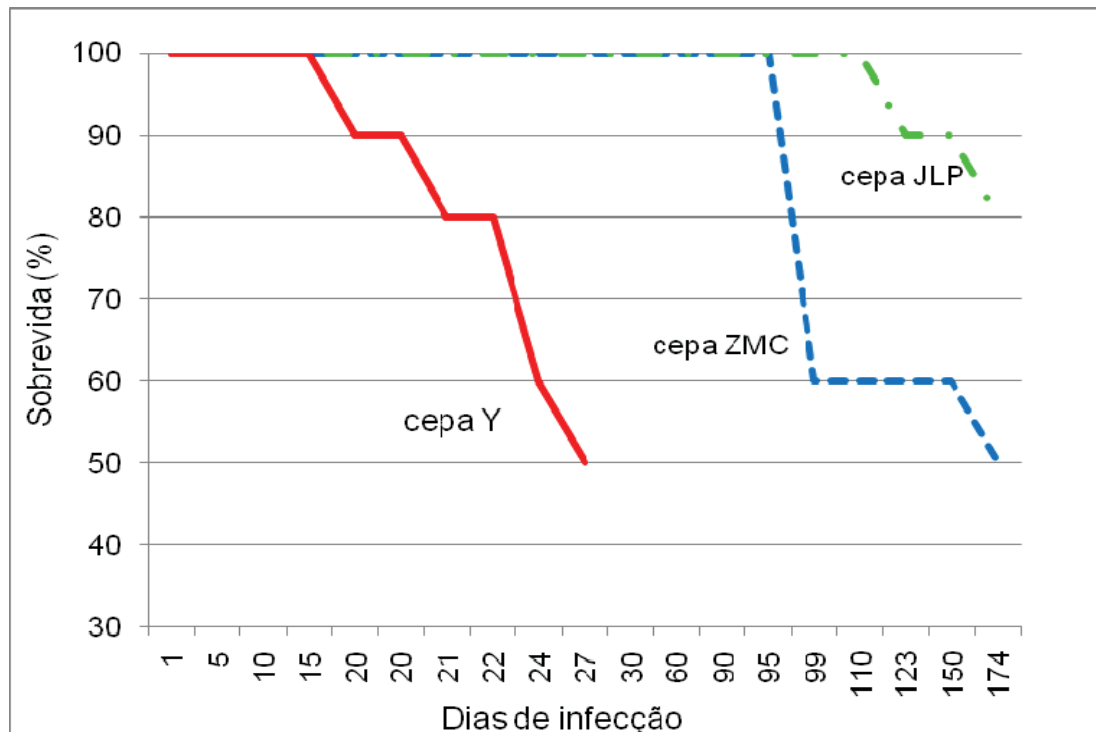


Figura 5. Curva de sobrevivência (média de 10 animais) de camundongos BALB/c, inoculados pela via intraperitoneal com 1×10^4 tripomastigotas/animal, com a **cepa Y, ZMC e JLP** de *T. cruzi*.

4.3. Expressão gênica relativa de receptores TLR 2 e TLR 4, nos cinco diferentes momentos (M1-M5) da evolução da infecção pelo *T. cruzi*, em G1, G2 e G3

A expressão gênica relativa do TLR 2 nos diferentes momentos (M1-M5) da infecção experimental pelas três cepas de *T. cruzi*: Y (G1), ZMC (G2) e JLP (G3) está representada na Figura 6. Assim, após 24 horas de infecção (M1), houve um aumento na expressão desse receptor nos animais infectados de G1 ($p < 0,0001$), G2 ($p < 0,0001$) e G3 ($p = 0,0004$), em relação ao momento anterior à infecção (M0). No início da fase aguda (M2), a expressão gênica do TLR 2 continuou aumentando em relação a M0 apenas em G1 ($p = 0,0064$), mantendo-se inalterada em G2 e G3 ($p = 0,9999$ e $0,9997$, respectivamente). No pico da fase aguda (M3), momento com maior número de parasitas circulantes, houve uma queda na expressão gênica do TLR 2 em G1, G2 e G3, em relação a M2 ($M2 > M3$; $p < 0,0001$, $< 0,0001$ e $= 0,0119$, respectivamente). No início da fase crônica (M4), quando ocorre uma queda do número de parasitas, a expressão gênica do TLR 2 volta a aumentar somente em G1 ($p < 0,05$), sem retornar, no entanto, às expressões mais elevadas de M1 e M2. Nos três grupos (G1, G2 e G3) aqui estudados, não houve diferença na expressão gênica deste receptor, do início da fase crônica (M4) até o início da morte dos animais (M5).

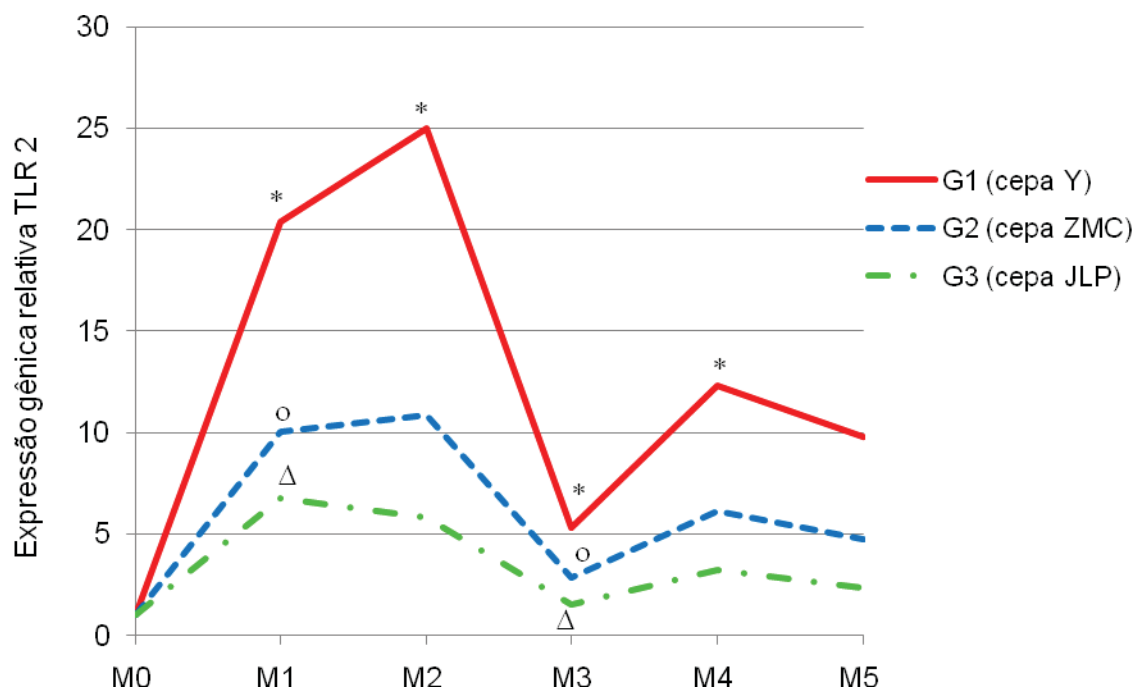


Figura 6. Expressão gênica relativa do **TLR 2** na evolução da infecção experimental pelo *T. cruzi* em G1, G2 e G3. M0: sem infecção; M1: 24h p.i.; M2: início fase aguda; M3: pico fase aguda; M4: início fase crônica; M5: fase crônica antes da morte. Amostras de três animais, em cada momento, foram analisadas em duplicata pela PCR em tempo real. Os valores dos animais infectados foram normalizados pela expressão da β -actina em cada amostra e comparados aos dos não infectados. A significância das diferenças na expressão gênica do receptor, entre os diferentes momentos da infecção foi dada em nível de 5% de probabilidade para as cepas Y (*), ZMC (°) e JLP (Δ).

Variável	Comentário	Valor de p
G1	M0 < M1 < M2 > M3 < M4 = M5	< 0,0001; 0,0064; < 0,0001; < 0,0001; 0,4173
G2	M0 < M1 = M2 > M3 < M4 = M5	< 0,0001; 0,9999; 0,0001; 0,1062; 0,9783
G3	M0 < M1 = M2 > M3 = M4 = M5	0,0004; 0,9997; 0,0119; 0,8921; 0,9997

A Figura 7 representa a expressão gênica do TLR 4 dos animais infectados, induzida pelas três cepas de *T. cruzi* Y (G1), ZMC (G2) e JLP (G3), nos diferentes momentos da infecção (M1-M5). Em relação aos valores obtidos antes da infecção (M0), os animais infectados de G1, G2 e G3 apresentaram aumento da expressão do receptor nas 24 horas após a infecção (M1) ($p < 0,0001$, $< 0,0001$, 0,0142, respectivamente). Em M2, a expressão gênica do TLR 4 permaneceu igual à de M1 nos três grupos ($p = 1,0000$; $= 1,0000$; $= 0,9942$, respectivamente para G1, G2 e G3).

Já, em M3, houve uma queda na expressão de TLR 4 nos animais de G1 e G2 ($p < 0,0001$; $< 0,0076$, respectivamente), que permaneceu igual em G3 ($p = 0,0741$). No início da fase crônica (M4), apenas os animais infectados com a cepa Y (G1) apresentaram aumento na expressão de TLR 4 em relação à de M3 ($p = 0,0125$), porém, sem atingir a expressão já encontrada em M1 e M2. Em M5, G1 teve diminuição da expressão gênica do receptor, em relação à M4 ($p = 0,0066$), mas, para G2 e G3, essa expressão permaneceu a mesma ($p = 1,000$; $= 0,999$, respectivamente).

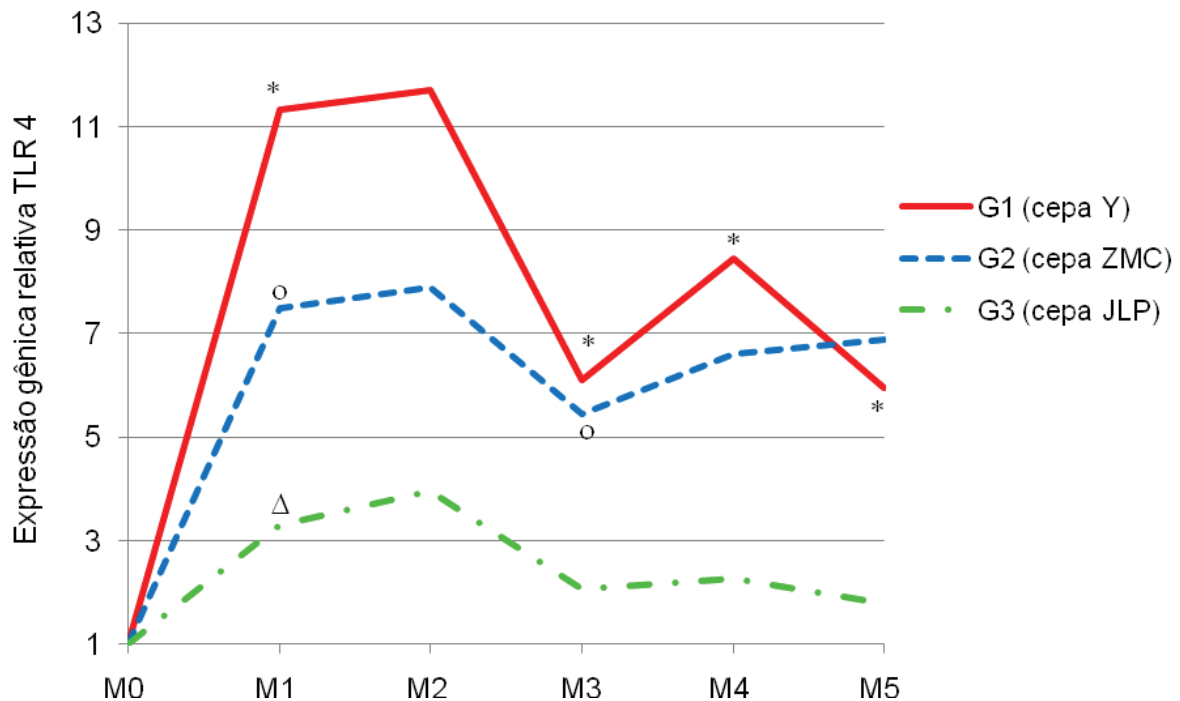


Figura 7. Expressão gênica relativa do **TLR 4** na evolução da infecção experimental pelo *T. cruzi* em G1, G2 e G3. M0: sem infecção; M1: 24h p.i.; M2: início fase aguda; M3: pico fase aguda; M4: início fase crônica; M5: fase crônica antes da morte. Amostras de três animais, em cada momento, foram analisadas em duplicata pela PCR em tempo real. Os valores dos animais infectados foram normalizados pela expressão da β -actina em cada amostra e comparados aos dos não infectados. A significância das diferenças na expressão gênica do receptor, entre os diferentes momentos da infecção foi dada em nível de 5% de probabilidade para as cepas Y (*), ZMC (°) e JLP (Δ).

Variável	Comentário	Valor de p
G1	M0 < M1 = M2 > M3 < M4 > M5	<0,0001; 1,0000; <0,0001; 0,0125; 0,0066
G2	M0 < M1 = M2 > M3 = M4 = M5	<0,0001; 1,0000; 0,0076; 0,6631; 1,0000
G3	M0 < M1 = M2 = M3 = M4 = M5	0,0142; 0,9942; 0,0741; 1,0000; 0,9999

4.4. Expressão gênica relativa de IL-12 p40, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 nos cinco diferentes momentos (M1-M5) da evolução da infecção pelo *T. cruzi*, em G1, G2 e G3

A Figura 8 apresenta os valores da expressão gênica relativa de IL-12 p40 nos diferentes momentos da infecção experimental com as cepas Y (G1), ZMC (G2) e JLP (G3). Em M1 (24 horas após a infecção), observa-se um aumento da expressão da citocina em G1, G2 e G3, em relação aos animais antes da infecção (M0) ($p < 0,0001$; $< 0,0001$; $= 0,0019$, respectivamente). Em M2, a expressão da IL-12 p40 continuou aumentando para os animais de G1 e G2 ($p < 0,0001$ e $< 0,0001$, respectivamente), mas, não, para os de G3 ($p = 0,3843$). No pico da parasitemia da fase aguda (M3), G1 apresentou uma queda na expressão da citocina ($p < 0,0001$), enquanto G2 e G3 mantiveram a mesma expressão observada em M2 ($p = 0,1338$; $= 0,3843$, respectivamente). No início da fase crônica (M4), G1 e G2 diminuíram a expressão da IL-12 p40 ($p < 0,0001$ e $< 0,0001$, respectivamente), enquanto que, em G3, ela permaneceu com os mesmos valores ($p = 0,9973$). Em M5, apenas em G1 a expressão gênica da IL-12 p40 foi menor que em M4 ($p = 0,0176$), permanecendo a mesma em G2 e G3 ($p = 0,7319$; $= 1,0000$, respectivamente).

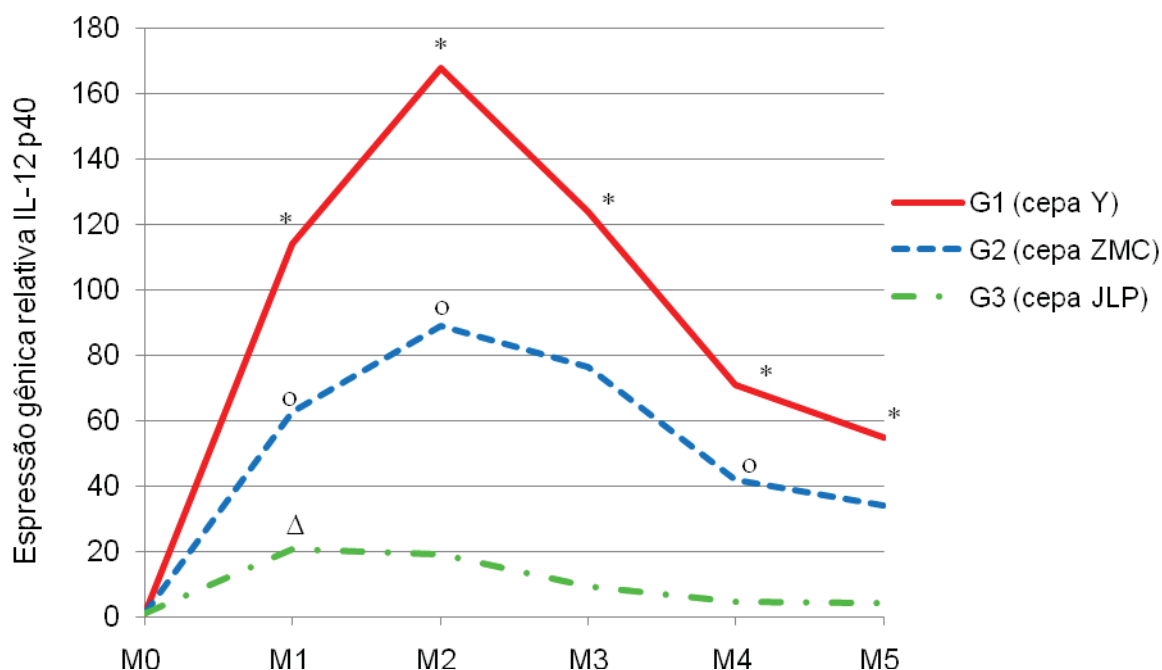


Figura 8. Expressão gênica relativa de **IL-12 p40** na evolução da infecção experimental pelo *T. cruzi* em G1, G2 e G3. M0: sem infecção; M1: 24h p.i.; M2: início fase aguda; M3: pico fase aguda; M4: início fase crônica; M5: fase crônica antes da morte. Amostras de três animais, em cada momento, foram analisadas em duplicata pela PCR em tempo real. Os valores dos animais infectados foram normalizados pela expressão da β -actina em cada amostra e comparados aos dos não infectados. A significância das diferenças na expressão gênica do receptor, entre os diferentes momentos da infecção foi dada em nível de 5% de probabilidade para as cepas Y (*), ZMC (°) e JLP (Δ).

Variável	Comentário	Significância p
G1	M0 < M1 < M2 > M3 > M4 > M5	<0,0001; <0,0001; <0,0001; <0,0001; 0,0176
G2	M0 < M1 < M2 = M3 > M4 = M5	<0,0001; <0,0001; 0,1338; <0,0001; 0,7319
G3	M0 < M1 = M2 = M3 = M4 = M5	0,0019; 1,0000; 0,3843; 0,9973; 1,0000

A Figura 9 representa a expressão gênica relativa do IFN- γ em diferentes momentos da infecção experimental de G1 (Y), G2 (ZMC) e G3 (JLP). Apenas nos animais de G1, notou-se aumento na expressão dessa citocina em M1 (24 horas após a infecção), em relação a M0 (antes da infecção) ($p=0,0248$). Nos grupos G2 e G3, a expressão gênica de IFN- γ permaneceu inalterada em M1 ($p=1,0000$; $p=0,9951$, respectivamente). Animais de G1 e G2 mostraram aumento na expressão de IFN- γ em M2, em relação a M1 ($p<0,0001$; $p=0,0003$, respectivamente), mas, em G3, essa permaneceu igual ($p=0,3404$). No pico da

infecção aguda (M3), houve aumento da expressão da citocina em G1, G2 e G3, em relação a M2 ($p < 0,0001$, $< 0,0001$; $< 0,0216$, respectivamente). No início da fase crônica (M4), houve queda na expressão do IFN- γ em G1, G2 e G3 ($p < 0,0001$; $= 0,0010$; $= 0,0003$, respectivamente), mais importante nos animais infectados com a cepa Y. No momento final da infecção, na fase crônica (M5), a expressão de IFN- γ caiu em G2 ($p < 0,0001$), mantendo-se inalterada em G1 e G3, em relação a M4 ($p = 1,0000$).

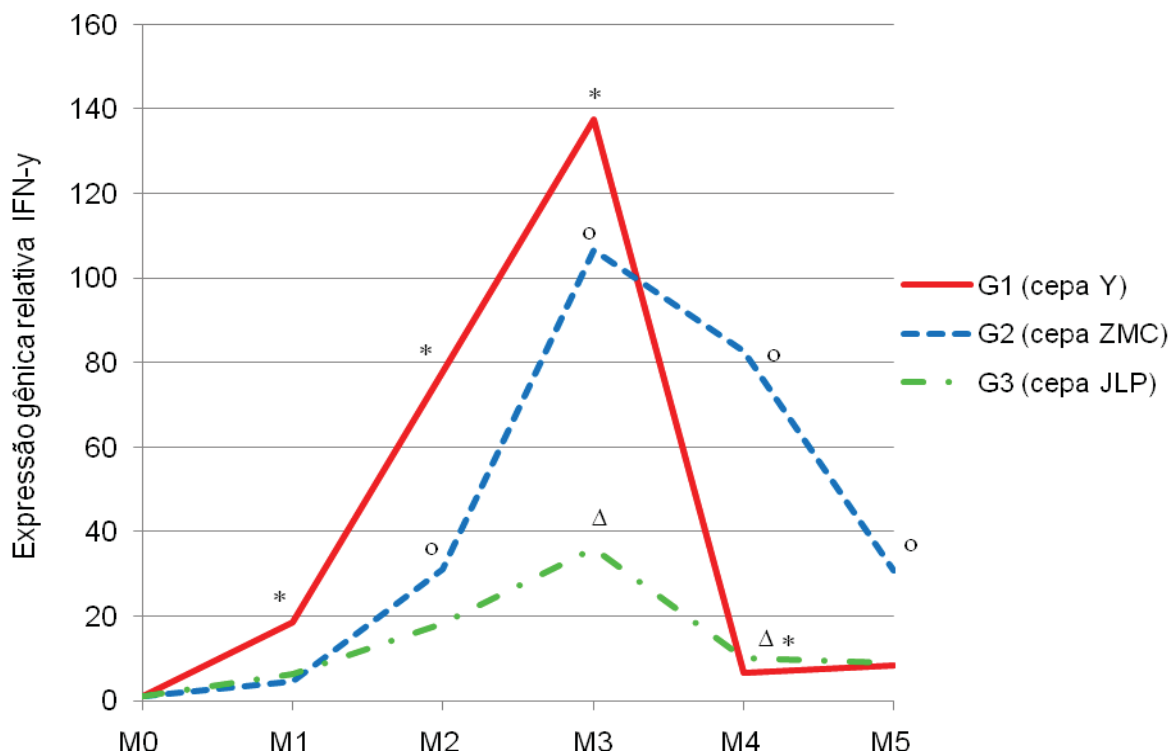


Figura 9. Expressão gênica relativa de IFN- γ na evolução da infecção experimental pelo *T. cruzi* em G1, G2 e G3. M0: sem infecção; M1: 24h p.i.; M2: início fase aguda; M3: pico fase aguda; M4: início fase crônica; M5: fase crônica antes da morte. Amostras de três animais, em cada momento, foram analisadas em duplicata pela PCR em tempo real. Os valores dos animais infectados foram normalizados pela expressão da β -actina em cada amostra e comparados aos dos não infectados. A significância das diferenças na expressão gênica do receptor, entre os diferentes momentos da infecção foi dada em nível de 5% de probabilidade para as cepas Y (*), ZMC (°) e JLP (Δ).

Variável	Comentário	Valor de p
G1	M0 < M1 < M2 < M3 > M4 = M5	0,0248; <0,0001; <0,0001; <0,0001; 1,0000
G2	M0 = M1 < M2 < M3 > M4 > M5	1,0000; 0,0003; <0,0001; 0,0010; <0,0001
G3	M0 = M1 = M2 < M3 > M4 = M5	0,9951; 0,3404; 0,0216; 0,0003; 1,0000

A Figura 10 mostra a indução de expressão de TNF- α pelas três cepas (Y, ZMC e JLP) de *T. cruzi*, nos diferentes momentos da infecção experimental (M1-M5). Em nenhum dos grupos de animais infectados houve modificação nos níveis da citocina, 24 horas após a infecção (G1, G2 e G3: M0=M1; $p=1,0000$; $p=0,7198$; $p=1,0000$, respectivamente). Em G1, houve aumento da expressão dessa citocina em M2 ($p=0,0006$), o mesmo não ocorrendo com G2 e G3 ($p=0,2149$; $p=0,10000$, respectivamente). Em M3 e M4, ocorreu um aumento progressivo da expressão de TNF- α em G1 ($p=0,0008$ e $p=0,0008$) e G2 ($p=0,0354$ e $p<0,0001$), mas não para G3 ($p=0,4970$; $p=0,4022$). Antes do início da mortalidade dos animais, em M5, G1, G2 e G3 apresentaram uma diminuição da expressão gênica do TNF- α em relação a M4 ($p<0,0001$, $p<0,0001$ e $p=0,0234$, respectivamente).

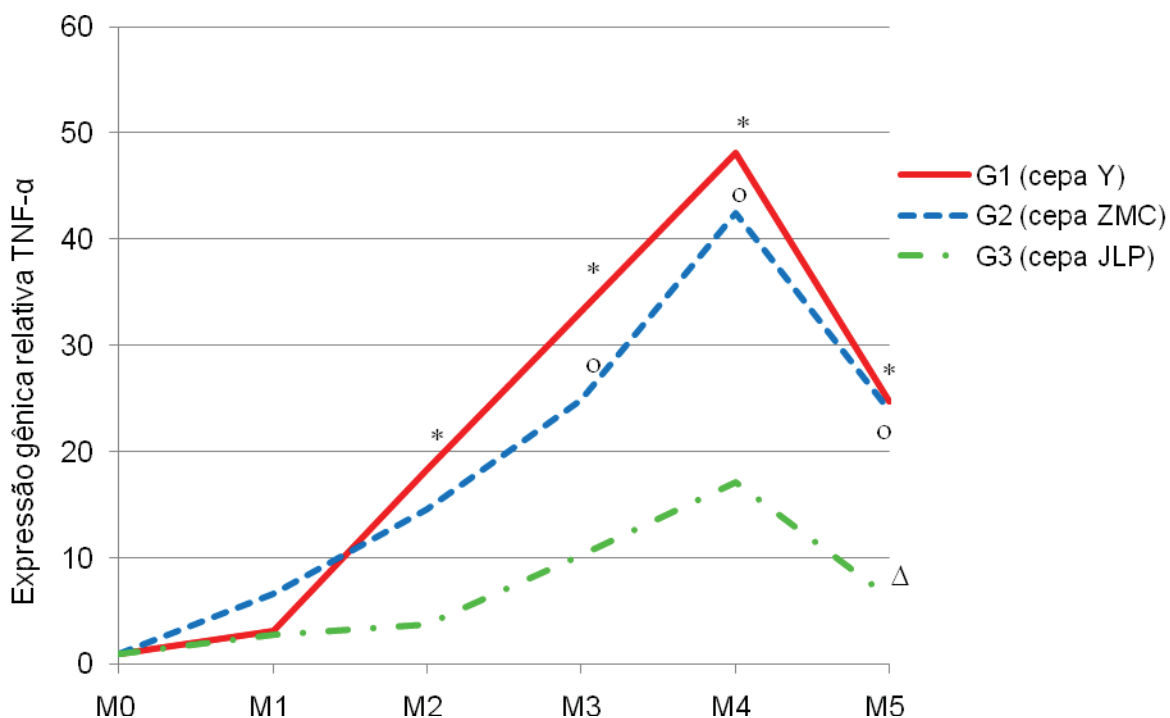


Figura 10. Expressão gênica relativa de **TNF-α** na evolução da infecção experimental pelo *T. cruzi* em G1, G2 e G3. M0: sem infecção; M1: 24h p.i.; M2: início fase aguda; M3: pico fase aguda; M4: início fase crônica; M5: fase crônica antes da morte. Amostras de três animais, em cada momento, foram analisadas em duplicata pela PCR em tempo real. Os valores dos animais infectados foram normalizados pela expressão da β -actina em cada amostra e comparados aos dos não infectados. A significância das diferenças na expressão gênica do receptor, entre os diferentes momentos da infecção foi dada em nível de 5% de probabilidade para as cepas Y (*), ZMC (°) e JLP (Δ).

Variável	Comentário	Significância
G1	M0 = M1 < M2 < M3 < M4 > M5	1,0000; 0,0006; 0,0008; 0,0008; <0,0001
G2	M0 = M1 = M2 < M3 < M4 > M5	0,7198; 0,2149; 0,0354; <0,0001; <0,0001
G3	M0 = M1 = M2 = M3 = M4 > M5	1,0000; 1,0000; 0,4970; 0,4022; 0,0234

A Figura 11 mostra que a expressão da IL-4, induzida pelas cepas Y, ZMC e JLP, nos diferentes momentos da infecção experimental, foi igual do início da infecção (M1), até o pico da parasitemia, na fase aguda (M3) (G1: $p=0,9209$, $p=1,0000$, $p=0,9782$; G2: $p=1,0000$, $p=1,0000$, $p=0,1481$; G3: $p=1,0000$, $p=1,0000$, $p=0,6582$). No início da fase crônica (M4), nota-se um aumento na expressão de IL-4 para G1 (Y) e G2 (ZMC) ($p<0,0001$ e $p<0,0001$, respectivamente). Em G3 (JLP), a expressão de IL-4 em M4 continua igual à de M3 ($p=0,2032$). Em M5, fase em

que os animais começam a morrer, foi verificada queda na expressão de IL-4 em G1, G2 e G3 ($p < 0,0001$, $p = 0,0091$ e $p = 0,0199$, respectivamente).

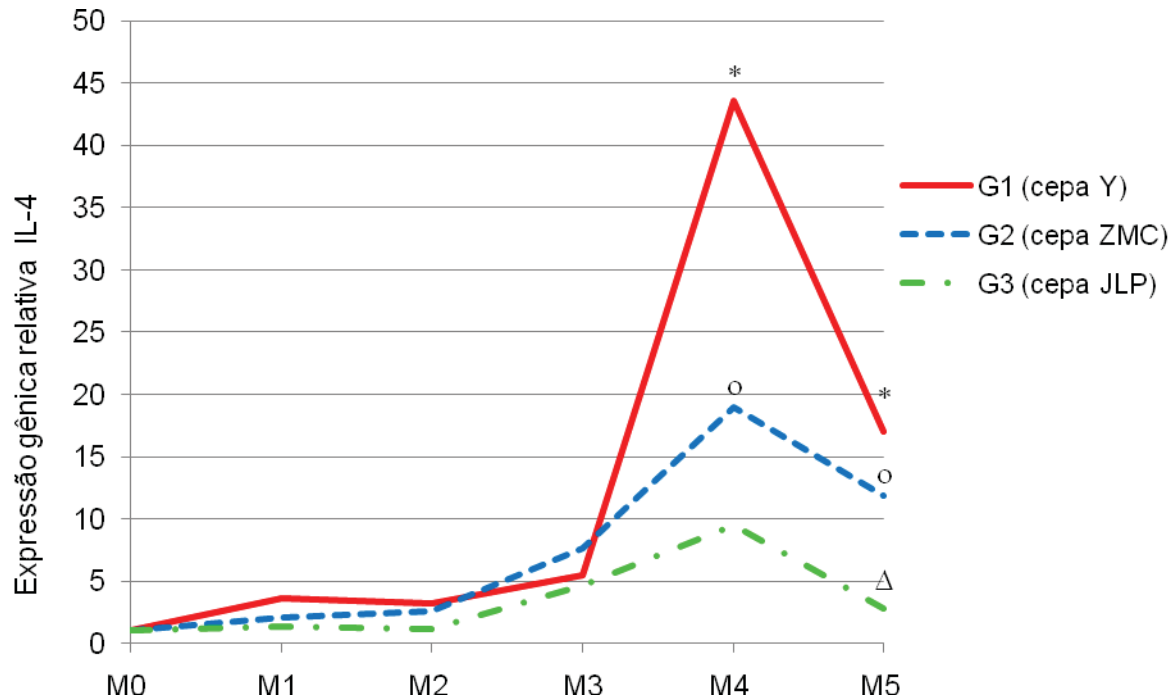


Figura11. Expressão gênica relativa de **IL-4** na evolução da infecção experimental pelo *T. cruzi* em G1, G2 e G3. M0: sem infecção; M1: 24h p.i.; M2: início fase aguda; M3: pico fase aguda; M4: início fase crônica; M5: fase crônica antes da morte. Amostras de três animais, em cada momento, foram analisadas em duplicata pela PCR em tempo real. Os valores dos animais infectados foram normalizados pela expressão da β -actina em cada amostra e comparados aos dos não infectados. A significância das diferenças na expressão gênica do receptor, entre os diferentes momentos da infecção foi dada em nível de 5% de probabilidade para as cepas Y (*), ZMC (°) e JLP (Δ).

Variável	Comentário	Significância
G1	M0 = M1 = M2 = M3 < M4 > M5	0,9209; 1,0000; 0,9782; <0,0001; <0,0001
G2	M0 = M1 = M2 = M3 < M4 > M5	1,0000; 1,0000; 0,1481; <0,0001; 0,0091
G3	M0 = M1 = M2 = M3 = M4 > M5	1,0000; 1,0000; 0,6582; 0,2032; 0,0199

A expressão gênica relativa da IL-10, nos diferentes momentos da infecção experimental (M1-M5), dos animais de G1, G2 e G3 (cepas Y, ZMC e JLP, respectivamente) está representada na Figura 12. Nota-se que, até o pico da fase aguda (M1 – M3), a expressão da IL-10 permaneceu constante nos três grupos estudados (G1: $p = 1,0000$; G2: $p = 1,0000$; $p = 1,0000$; $p = 0,7945$; G3: $p = 1,0000$;

$p=1,0000$; $p=0,9509$). Em M4 (início da fase crônica), observou-se aumento da citocina em G1, G2 e G3 ($p<0,0001$, $p<0,0001$ e $p=0,0068$, respectivamente). Em M5, apenas em G1 foi observado aumento da expressão gênica de IL-10 ($p=0,0009$), sendo que, em G2 e G3, os valores permaneceram os mesmos observados para M4 ($p=0,9998$; $p=1,0000$, respectivamente).

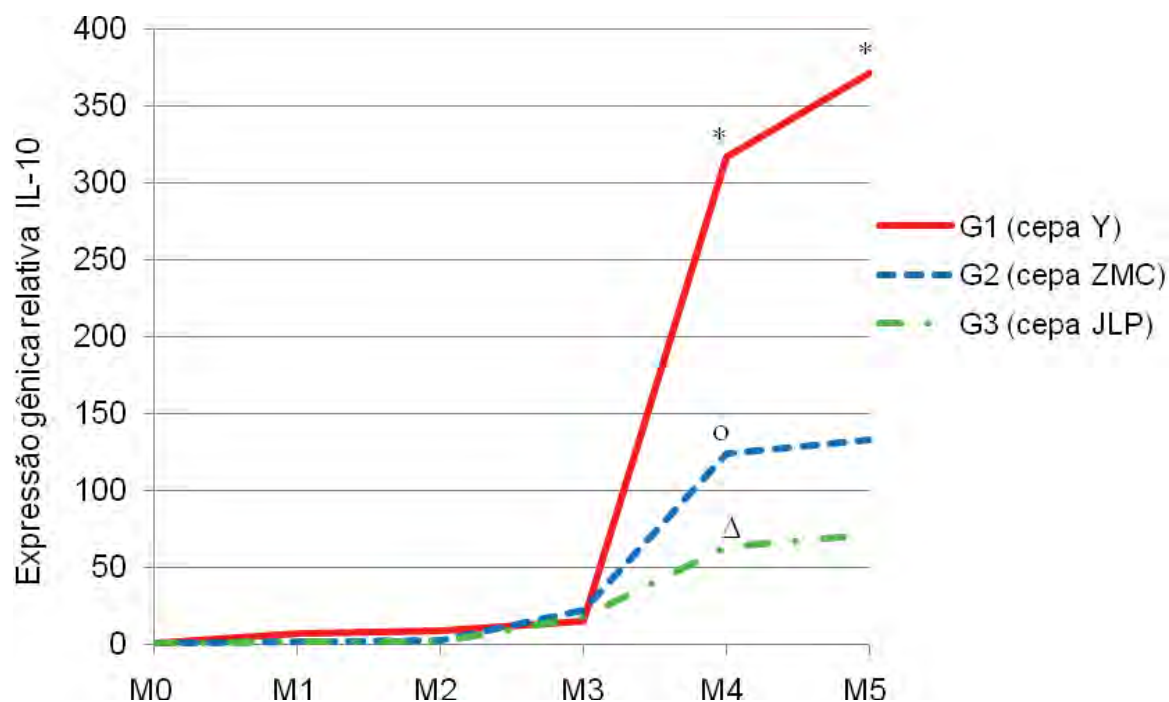


Figura 12. Expressão gênica relativa de **IL-10** na evolução da infecção experimental pelo *T. cruzi* em G1, G2 e G3. M0: sem infecção; M1: 24h p.i.; M2: início fase aguda; M3: pico fase aguda; M4: início fase crônica; M5: fase crônica antes da morte. Amostras de três animais, em cada momento, foram analisadas em duplicata pela PCR em tempo real. Os valores dos animais infectados foram normalizados pela expressão da β -actina em cada amostra e comparados aos dos não infectados. A significância das diferenças na expressão gênica do receptor, entre os diferentes momentos da infecção foi dada em nível de 5% de probabilidade para as cepas Y (*), ZMC (°) e JLP (Δ).

Variável	Comentário	Significância
G1	M0 = M1 = M2 = M3 < M4 < M5	1,0000; 1,0000; 1,0000; <0,0001; 0,0009
G2	M0 = M1 = M2 = M3 < M4 = M5	1,0000; 1,0000; 0,7945; <0,0001; 0,9998
G3	M0 = M1 = M2 = M3 < M4 = M5	1,0000; 1,0000; 0,9509; 0,0068; 1,0000

A expressão gênica relativa do TLR 2 e 4 e citocinas, em cada momento, dos animais de G1, G2 e G3, pode ser encontrada nos Apêndices 2, 3 e 4.

4.5. Comparação da expressão gênica relativa dos receptores TLR 2 e TLR 4, entre G1, G2 e G3, em cada um dos cinco momentos (M1-M5) da evolução da infecção pelo *T. cruzi*

Os grupos G1, G2 e G3 foram comparados, entre si, em cada momento (M1-M5) da infecção por *T. cruzi*, para investigar se havia diferença na expressão gênica do TLR 2 relacionada às cepas utilizadas Y (G1), ZMC (G2) e JLP (G3) (Tabela 1). Assim, observou-se, em M1, que G1 apresentou expressão maior desse receptor em relação a G2 e G3 ($p < 0,0001$), e G2, expressão igual a G3 ($p = 0,1050$). No segundo momento (M2), foi observada maior expressão de TLR 2 em G1 do que em G2 e G3 ($p < 0,0001$), sendo que, em G2, foi maior do que em G3 ($p = 0,0021$). Em M3, momento de maior parasitemia, G1 apresentou expressão gênica de TLR 2 maior que G3 ($p < 0,0376$), mas igual a G2 ($p = 0,4355$). Nesse momento, os grupos G2 e G3 não diferiram entre si ($p = 0,9890$). Já, em M4, G1 apresentou maior expressão do receptor em relação a G2 e G3 ($p < 0,0002$ e $p < 0,0001$, respectivamente), o que se repetiu em M5: G1 > G2 ($p = 0,0019$); G1 > G3 ($p < 0,0001$). Em M4 e M5, G2 e G3 não diferiram entre si ($p = 0,2392$ e $p = 0,4922$, respectivamente).

Tabela 1. Comparação da expressão gênica relativa do TLR 2 entre os animais infectados com as cepas Y(G1), ZMC (G2) e JLP (G3) nos diferentes momentos após infecção.

TLR 2	M1	M2	M3	M4	M5
	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$
G1	20,4 $\pm$ 1,68	24,96 $\pm$ 1,05	5,29 $\pm$ 0,94	12,3 $\pm$ 1,54	9,79 $\pm$ 1,59
G2	10,03 $\pm$ 0,96	10,84 $\pm$ 2,06	2,82 $\pm$ 0,79	6,1 $\pm$ 1,21	4,71 $\pm$ 1,59
G3	6,74 $\pm$ 0,97	5,8 $\pm$ 1,06	1,52 $\pm$ 0,59	3,24 $\pm$ 0,84	2,31 $\pm$ 0,88

χ : média; dp: desvio padrão. M0: sem infecção; M1: 24h p.i.; M2: início fase aguda; M3: pico fase aguda; M4: início fase crônica; M5: fase crônica antes da morte.

<i>Momento</i>	<i>Estatística calculada</i>	<i>Valor de p</i>	<i>Comentário</i>
M1	<i>Tukey</i>	G1 x G2 < 0,0001; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 = 0,1050	G1 > G2 = G3 < G1
M2	<i>Tukey</i>	G1 x G2 < 0,0001; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 = 0,0021	G1 > G2 > G3 < G1
M3	<i>Tukey</i>	G1 x G2 = 0,4355; G1 x G3 = 0,0376; G2 x G3 = 0,9890	G1 = G2 = G3 < G1
M4	<i>Tukey</i>	G1 x G2 = 0,0002; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 = 0,2392	G1 > G2 = G3 < G1
M5	<i>Tukey</i>	G1 x G2 = 0,0019; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 = 0,4922	G1 > G2 = G3 < G1

Quando foi analisada a diferença de expressão gênica do TLR 4 entre G1, G2 e G3 em cada um dos cinco momentos, separadamente, observou-se que, em M1 e M2, G1 apresentou expressão maior em relação a G2 e G3 ($p < 0,0001$), sendo que, em G2, a expressão gênica foi maior que em G3 ($p < 0,0001$) (Tabela 2). Em M3, M4 e M5, G1 e G2 tiveram a mesma expressão gênica ($p = 0,9947$, $p = 0,0965$ e $p = 0,0772$, respectivamente). Nesses momentos, em G1, a expressão de TLR 4 foi maior que em G3 ($p < 0,0001$), o mesmo ocorrendo com G2, com expressão sempre maior que em G3 ($p = 0,0002$, $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$).

Tabela 2. Comparação da expressão gênica relativa do TLR 4 entre os animais infectados com as cepas Y(G1), ZMC (G2) e JLP (G3) nos diferentes momentos após infecção.

TLR 4	M1	M2	M3	M4	M5
	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$
G1	11,32 $\pm$ 0,98	11,7 $\pm$ 0,65	6,11 $\pm$ 0,3	8,44 $\pm$ 0,7	5,95 $\pm$ 0,88
G2	7,49 $\pm$ 0,60	7,90 $\pm$ 0,75	5,45 $\pm$ 0,65	6,62 $\pm$ 0,81	6,89 $\pm$ 0,43
G3	3,30 $\pm$ 0,61	3,97 $\pm$ 0,86	2,07 $\pm$ 0,18	2,28 $\pm$ 0,61	1,8 $\pm$ 0,48

χ : média; dp: desvio padrão. M0: sem infecção; M1: 24h p.i.; M2: início fase aguda; M3: pico fase aguda; M4: início fase crônica; M5: fase crônica antes da morte.

Momento	Estatística calculada	Valor de p	Comentário
M1	Tukey	G1 x G2 < 0,0001; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 < 0,0001	G1 > G2 > G3 < G1
M2	Tukey	G1 x G2 < 0,0001; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 < 0,0001	G1 > G2 > G3 < G1
M3	Tukey	G1 x G2 = 0,9947; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 = 0,0002	G1 = G2 > G3 < G1
M4	Tukey	G1 x G2 = 0,0965; G1 x G3 < 0,0001; G3 x G2 < 0,0001	G1 = G2 > G3 < G1
M5	Tukey	G1 x G2 = 0,0772; G1 x G3 < 0,0001; G3 x G2 < 0,0001	G1 = G2 > G3 < G1

4.6. Comparação da expressão gênica relativa de IL-12 p40, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10, entre G1, G2 e G3, em cada um dos cinco momentos (M1-M5) da evolução da infecção pelo *T. cruzi*

Os grupos G1, G2 e G3, infectados respectivamente pelas cepas Y, ZMC e JLP do *T. cruzi*, foram comparados entre si, em cada momento (M1-M5) da infecção, para investigar se havia diferença na expressão gênica das citocinas IL-12 p40, IFN- γ e TNF- α , IL-4 e IL-10.

Como se observa na Tabela 3, a expressão gênica da IL-12 p40 em G1 foi, em todos os momentos, maior que em G2 (M1-M4: $p < 0,0001$; M5: $p < 0,001$) e em G3 (M1-M5: $p < 0,0001$). Também, em todos os momentos, os animais de G2 tiveram maior expressão gênica da IL-12 p40 que os de G3 (M1-M5: $p < 0,0001$).

Tabela 3. Comparação da expressão gênica relativa da IL-12 p40 entre os animais infectados com as cepas Y(G1), ZMC (G2) e JLP (G3) nos diferentes momentos após infecção.

IL-12	M1	M2	M3	M4	M5
p40	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$
G1	113,76 $\pm$ 9,11	167,5 $\pm$ 7,74	123,78 $\pm$ 10,02	70,78 $\pm$ 6,23	54,73 $\pm$ 5,28
G2	62,61 $\pm$ 3,76	88,66 $\pm$ 1,71	76,3 $\pm$ 2,27	41,81 $\pm$ 1,59	33,91 $\pm$ 2,13
G3	20,77 $\pm$ 1,73	19,05 $\pm$ 1,52	9,04 $\pm$ 0,94	4,65 $\pm$ 0,52	4,05 $\pm$ 0,82

χ : média; dp: desvio padrão. M0: sem infecção; M1: 24h p.i.; M2: início fase aguda; M3: pico fase aguda; M4: início fase crônica; M5: fase crônica antes da morte.

<i>Momento</i>	<i>Estatística calculada</i>	<i>Valor de p</i>	<i>Comentário</i>
M1	Tukey	G1 x G2 < 0,0001; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 < 0,0001	G1 > G2 > G3 < G1
M2	Tukey	G1 x G2 < 0,0001; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 < 0,0001	G1 > G2 > G3 < G1
M3	Tukey	G1 x G2 < 0,0001; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 < 0,0001	G1 > G2 > G3 < G1
M4	Tukey	G1 x G2 < 0,0001; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 < 0,0001	G1 > G2 > G3 < G1
M5	Tukey	G1 x G2 = 0,0010; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 < 0,0001	G1 > G2 > G3 < G1

A Tabela 4 representa a diferença da expressão gênica do IFN- γ em G1, G2 e G3, entre os cinco momentos após a infecção experimental. Em M1, não houve diferença na expressão de IFN- γ entre G1 e G2 ($p=0,1366$), G1 e G3 ($p=0,2788$) e G2 e G3 ($p=1,0000$). Já, em M2, a expressão da citocina em G1 foi maior que em G2 ($p<0,0010$) e em G3 ($p<0,0001$); nesse momento, G2 não diferiu de G3 ($p=0,2189$). Em M3, a expressão continuou sendo maior em G1 que em G2 ($p<0,0001$) e em G3 ($p<0,0001$). Em M4 e M5, G1 teve expressão menor que em G2 ($p<0,0001$ e $p<0,0019$, respectivamente) e igual a G3 ($p=1,000$); em G2, a expressão de IFN- γ foi sempre maior que em G3 ($p<0,0001$ e $p<0,0027$, respectivamente).

Tabela 4. Comparação da expressão gênica relativa do IFN- γ entre os animais infectados com as cepas Y(G1), ZMC (G2) e JLP (G3) nos diferentes momentos após infecção.

INF- γ	M1	M2	M3	M4	M5
	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$
G1	18,66 $\pm$ 4,9	77,84 $\pm$ 7,93	137,43 $\pm$ 13,82	6,53 $\pm$ 2,28	8,29 $\pm$ 3,05
G2	4,58 $\pm$ 2,11	31,08 $\pm$ 1,3	106,7 $\pm$ 5,65	82,76 $\pm$ 4,59	30,94 $\pm$ 7,6
G3	6,32 $\pm$ 1,66	18,12 $\pm$ 2,83	36,05 $\pm$ 4,42	9,99 $\pm$ 2,16	8,97 $\pm$ 2,94

χ : média; dp: desvio padrão. M0: sem infecção; M1: 24h p.i.; M2: início fase aguda; M3: pico fase aguda; M4: início fase crônica; M5: fase crônica antes da morte.

Momento	Estatística calculada	Valor de p	Comentário
M1	Tukey	G1 x G2 = 0,1366; G1 x G3 = 0,2788; G2 x G3 = 1,0000	G1 = G2 = G3 = G1
M2	Tukey	G1 x G2 = 0,0010; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 = 0,2189	G1 > G2 = G3 < G1
M3	Tukey	G1 x G2 < 0,0001; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 < 0,0001	G1 > G2 > G3 < G1
M4	Tukey	G1 x G2 < 0,0001; G1 x G3 = 1,0000; G2 x G3 < 0,0001	G1 < G2 > G3 = G1
M5	Tukey	G1 x G2 = 0,0019; G1 x G3 = 1,0000; G2 x G3 = 0,0027	G1 < G2 > G3 = G1

A diferença de expressão gênica do TNF- α entre os grupos, em cada um dos cinco momentos estudados, está representada na Tabela 5. Nota-se que, em M1, e somente nesse momento, G1 apresentou a mesma expressão da citocina em relação a G2 ($p=0,9917$) e a G3 ($p=1,000$), o mesmo ocorrendo em relação a G2 e G3 ($p=0,9773$). A partir de M2, até M5, a expressão do TNF- α em G1 não diferiu da de G2 ($p=0,9754$, $p=0,1673$, $p=0,7019$ e $p=1,000$, respectivamente). Já, em todos esses momentos, G2 apresentou maior expressão gênica da citocina do que G3 ($p=0,0246$, $p=0,0009$, $p<0,0001$ e $p<0,0001$, respectivamente) e, G3, menor do que G1 (M2: $p=0,0010$; M3-M5: $p<0,0001$).

Tabela 5. Comparação da expressão gênica relativa do **TNF- α** entre os animais infectados com as cepas Y(G1), ZMC (G2) e JLP (G3) nos diferentes momentos após infecção.

TNF-α	M1	M2	M3	M4	M5
	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$
G1	3,15 $\pm$ 0,76	18,37 $\pm$ 3,22	33,2 $\pm$ 5,73	48,07 $\pm$ 3,81	24,76 $\pm$ 0,27
G2	6,57 $\pm$ 1,39	14,52 $\pm$ 1,32	24,88 $\pm$ 4,57	42,42 $\pm$ 5,79	23,85 $\pm$ 5,94
G3	2,75 $\pm$ 0,82	3,71 $\pm$ 0,37	10,21 $\pm$ 1,98	17,12 $\pm$ 3,08	6,25 $\pm$ 1,81

χ : média; dp: desvio padrão. M0: sem infecção; M1: 24h p.i.; M2: início fase aguda; M3: pico fase aguda; M4: início fase crônica; M5: fase crônica antes da morte.

<i>Momento</i>	<i>Estatística calculada</i>	<i>Valor de p</i>	<i>Comentário</i>
M1	Tukey	G1 x G2 = 0,9917; G1 x G3 = 1,0000; G2 x G3 = 0,9773	G1 = G2 = G3 = G1
M2	Tukey	G1 x G2 = 0,9754; G1 x G3 = 0,0010; G2 x G3 = 0,0246	G1 = G2 > G3 < G1
M3	Tukey	G1 x G2 = 0,1673; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 = 0,0009	G1 = G2 > G3 < G1
M4	Tukey	G1 x G2 = 0,7019; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 < 0,0001	G1 = G2 > G3 < G1
M5	Tukey	G1 x G2 = 1,0000; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 < 0,0001	G1 = G2 > G3 < G1

A Tabela 6 mostra que não houve diferença na expressão de IL-4, entre os grupos, nos três primeiros momentos do estudo. Assim, em M1: G1=G2 (p=0,9995), G1=G3 (p=0,9737), G2=G3 (p=1,0000); M2: G1=G2 (p=1,0000), G1=G3 (p=0,9903), G2=G3 (p=0,9998); M3: G1=G2 (p=0,9853), G1=G3 (p=1,0000), G2=G3 (p=0,8236). Já, em M4, a expressão em G1 foi maior que em G2 e G3 (p<0,0001 e p<0,0003, respectivamente) e, em G2, maior que em G3 (p<0,0001). Em M5, G1 não diferiu de G2 (p=0,1293), mas, em ambos, a expressão gênica de IL-4 foi maior que a de G3 (p< 0,0001; p< 0,0007).

Tabela 6. Comparação da expressão gênica relativa da IL-4 entre os animais infectados com as cepas Y(G1), ZMC (G2) e JLP (G3) nos diferentes momentos após infecção.

IL-4	M1	M2	M3	M4	M5
	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$
G1	3,67 $\pm$ 1,52	3,25 $\pm$ 0,29	5,52 $\pm$ 1,01	43,58 $\pm$ 5,75	17,01 $\pm$ 1,02
G2	2,08 $\pm$ 0,73	2,63 $\pm$ 0,81	7,69 $\pm$ 2,19	18,98 $\pm$ 3,47	11,83 $\pm$ 1,39
G3	1,35 $\pm$ 0,19	1,19 $\pm$ 0,05	4,66 $\pm$ 0,76	9,45 $\pm$ 1,35	2,85 $\pm$ 0,32

χ : média; dp: desvio padrão. M0: sem infecção; M1: 24h p.i.; M2: início fase aguda; M3: pico fase aguda; M4: início fase crônica; M5: fase crônica antes da morte.

Momento	Estatística calculada	Valor de p	Comentário
M1	Tukey	G1 x G2 = 0,9995; G1 x G3 = 0,9737; G2 x G3 = 1,0000	G1 = G2 = G3 = G1
M2	Tukey	G1 x G2 = 1,0000; G1 x G3 = 0,9903; G2 x G3 = 0,9998	G1 = G2 = G3 = G1
M3	Tukey	G1 x G2 = 0,9853; G1 x G3 = 1,0000; G2 x G3 = 0,8236	G1 = G2 = G3 = G1
M4	Tukey	G1 x G2 < 0,0001; G1 x G3 = 0,0003; G2 x G3 < 0,0001	G1 > G2 > G3 < G1
M5	Tukey	G1 x G2 = 0,1293; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 = 0,0007	G1 = G2 > G3 < G1

Quanto à expressão de IL-10, os grupos de estudo também não diferiram entre si nos três primeiros momentos do estudo. Deste modo, em M1: G1=G2 (p=1,0000), G1=G3 (p=1,0000), G2=G3 (p=1,0000); em M2: G1=G2 (p=1,0000), G1=G3 (p=1,0000), G2=G3 (p=1,0000); em M3: G1=G2 (p=1,0000), G1=G3 (p=1,0000), G2=G3 (p=1,0000). Em M4 e M5, G1 teve maior expressão gênica de IL-10 que G2 e G3 (p=<0,0001) e G2, maior que G3 (p=0,0002). (Tabela 7)

Tabela 7. Comparação da expressão gênica relativa da IL-10 entre os animais infectados com as cepas Y(G1), ZMC (G2) e JLP (G3) nos diferentes momentos após infecção.

IL-10	M1	M2	M3	M4	M5
	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$	$\chi \pm dp$
G1	6,51 $\pm$ 1,83	8,39 $\pm$ 2,12	14,84 $\pm$ 1,74	316,17 $\pm$ 25,86	370,71 $\pm$ 29,48
G2	1,45 $\pm$ 0,58	2,46 $\pm$ 0,63	21,79 $\pm$ 6,05	123,4 $\pm$ 19,14	132,33 $\pm$ 16,42
G3	1,51 $\pm$ 0,49	1,9 $\pm$ 0,79	17,4 $\pm$ 5,72	63,02 $\pm$ 6,54	70,86 $\pm$ 3,69

χ : média; dp: desvio padrão. M0: sem infecção; M1: 24h p.i.; M2: início fase aguda; M3: pico fase aguda; M4: início fase crônica; M5: fase crônica antes da morte.

Momento	Estatística calculada	Valor de p	Comentário
M1	Tukey	G1 x G2 = 1,0000; G1 x G3 = 1,0000; G2 x G3 = 1,0000	G1 = G2 = G3 = G1
M2	Tukey	G1 x G2 = 1,0000; G1 x G3 = 1,0000; G2 x G3 = 1,0000	G1 = G2 = G3 = G1
M3	Tukey	G1 x G2 = 1,0000; G1 x G3 = 1,0000; G2 x G3 = 1,0000	G1 = G2 = G3 = G1
M4	Tukey	G1 x G2 < 0,0001; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 = 0,0002	G1 > G2 > G3 < G1
M5	Tukey	G1 x G2 < 0,0001; G1 x G3 < 0,0001; G2 x G3 = 0,0002	G1 > G2 > G3 < G1

5. DISCUSSÃO

Modelos murinos e isogênicos são freqüentemente utilizados no estudo da DCh, pois respondem de forma homogênea e oferecem resultados reprodutíveis, além de tornar possível o controle dos fatores ambientais, do tipo do parasita, da quantidade do inóculo e da via de infecção ⁸⁸. A escolha desse modelo foi importante para o presente trabalho, pois pôde-se observar o comportamento de cada uma das três cepas do protozoário, de diferentes origens. A caracterização das cepas de *T. cruzi* permitiu melhor interpretação e comparação dos resultados obtidos no estudo da resposta imune, neste trabalho.

Como se sabe, a cepa Y está envolvida na infecção peridomiciliar e constitui uma das mais utilizadas nos modelos murinos de infecção. Estudos mostram que essa cepa induz altos níveis de parasitemia, mortalidade precoce na maioria das linhagens de camundongos e causa lesões teciduais graves ⁸⁹. O mesmo foi observado, no presente trabalho, pois os animais infectados com a cepa Y tiveram parasitemia alta, que atingiu o pico no sétimo dia pós-infecção e mortalidade precoce. No entanto, cepas que determinam parasitemia alta não são bons representantes dos agentes infecciosos envolvidos nas doenças humanas. Em muitos pacientes, a infecção chagásica transcorre sem ser percebida, sendo o diagnóstico realizado anos mais tarde, por ocasião de exames de laboratório rotineiros ou pelo aparecimento de sintomas da doença crônica. Outro fator é que, devido ao curso intenso e abrupto da infecção, modelos de alta virulência não permitem definir, com precisão, a relativa importância dos elementos envolvidos no controle do *T. cruzi*, bem como a extensão dos processos patogênicos. Por isso, no

presente trabalho, foram estudadas duas cepas adicionais, isoladas de pacientes chagásicos crônicos, a ZMC e JLP.

Toda essa desigualdade no comportamento é, mesmo, esperada, pois sabe-se que as cepas de *T. cruzi* constituem-se de populações multiclonais, que diferem segundo a composição antigênica, a morfologia, a susceptibilidade a quimioterápicos, os padrões isoenzimáticos, os padrões genômicos de kDNA e a capacidade de se inter-relacionar com o hospedeiro vertebrado ^{90,91,92}. Essas diferenças ocorrem entre grupos distintos ou dentro do mesmo grupo. Neste trabalho, tanto as cepas ZMC e JLP, isoladas de pacientes crônicos, quanto a Y foram classificadas como TC II (doméstica), o que concorda com vários estudos brasileiros, que mostram que a maioria das cepas encontradas em pacientes são domésticas ^{73,75,93,94}. Lages-Siva et al. ⁹⁵ estudaram pacientes da região do Triângulo Mineiro – MG, com as formas cardíaca, digestiva e indeterminada da DCh e todos eram infectados com cepas do grupo TCII.

Em relação à virulência, Fernandes et al. ⁹⁶, Oliveira et al. ⁹⁷ e Silva et al. ⁹⁸ relataram que, em pacientes chagásicos crônicos, há predominância de cepas de baixa virulência para camundongos. O mesmo foi observado, neste estudo, com as cepas ZMC e JLP, provenientes de pacientes chagásicos crônicos, com baixa virulência para os animais infectados, o que se depreendeu da pouca quantidade de parasitas encontrada em G2 e G3.

O conceito de virulência, geralmente ligado à maior ou menor capacidade de multiplicação do parasita, próprio para uma determinada cepa, também varia com fatores ambientais, imunológicos e possível seleção de cepas e clones no hospedeiro, podendo, assim, ser atenuada ou exaltada ^{99,100,101}. Exemplo disso é a história da cepa Y (TCII), originalmente isolada, em 1953, por Silva & Nussenzweig

¹⁰². A cepa, mantida em laboratório por repiques sucessivos em camundongos, apresentou, após dois anos, aumento na virulência, levando à morte praticamente 100% dos animais infectados. Outro exemplo vem de trabalho recente, de Espinoza et al. ¹⁰³, que infectaram camundongos BALB/c com duas cepas mexicanas de *T. cruzi*, caracterizadas como TCI. Os autores demonstraram que, apesar de as cepas serem geneticamente similares, possuíam diferenças importantes quanto à evolução da infecção, patogênese e resposta imune. As cepas apresentaram diferenças no número de parasitas circulantes no animal, na taxa de mortalidade que determinaram, na produção de anticorpos e citocinas que induziram, no tamanho do baço, assim como no aspecto físico dos animais infectados: aqueles com a cepa mais virulenta, apresentaram pêlos arrepiados, paralisia do trem posterior e aumento notável do tamanho do baço.

As divergências no comportamento evolutivo de animais infectados podem, ainda, estar ligadas aos diferentes subgrupos de TCII, que determinam uma população complexa e de comportamento heterogêneo. Amostras isoladas de indivíduos de áreas endêmicas do Cone Sul (Chile, Argentina, Bolívia, Uruguai, Paraguai e Brasil – exceto Amazônia) foram genotipadas como TCIIb, IId e Ile ^{76,81,95,104,105,106,107,108,109}. Esses mesmos subgrupos têm sido encontrados em amostras obtidas de pacientes com manifestações clínicas graves (cardíacas e digestivas), o que demonstra, portanto, sua capacidade em causar doença ¹¹⁰.

Mais recentemente, Zingales et al. ¹¹¹ propuseram, e vêm utilizando, um novo consenso para a nomenclatura intra-específica do *T. cruzi*. Assim, ao invés de grupos e subgrupos, os autores sugerem uma divisão em DTUs (*Discrete Typing Units*), de acordo com seu *background* genético: TCI a TCVI. A distribuição geográfica desses tipos genéticos é diferente e tem implicações epidemiológicas.

Se a classificação, de acordo com o *background* genético, fosse adotada, na presente pesquisa, pode ser que as cepas utilizadas estivessem em diferentes DTUs, o que justificaria as diferenças observadas no estudo da resposta imune dos animais infectados dos três grupos. Assim, a cepa Y, a mais virulenta, causou alta parasitemia em todo o curso da infecção e levou os animais à morte mais precocemente. A cepa JLP foi a menos agressiva, com baixa concentração de parasitas circulantes e com a menor taxa de mortalidade dos animais. Já, a cepa ZMC apresentou um comportamento intermediário. As três cepas também divergiram quanto ao tempo transcorrido até o momento de maior parasitemia, na infecção aguda, e que definiu os momentos diferentes de sacrifício dos animais infectados com cada uma delas.

Na infecção pelo *T. cruzi*, o primeiro elemento que garante a sobrevivência do parasita é a penetração nas células do hospedeiro ¹¹². Várias moléculas presentes nessas células, como os TLRs e na superfície do parasita são essenciais para o processo ativo de invasão celular e são capazes de estimular a resposta imune inata, no primeiro encontro ²⁰. Tripomastigotas da cepa Y induzem a produção de citocinas e a liberação de NO por macrófagos, de maneira dependente do TLR 2 ²⁴.

Assim, neste trabalho, a expressão gênica relativa do TLR 2 foi induzida, já no início da infecção, por células esplênicas dos camundongos infectados com as três cepas de *T. cruzi*. A expressão gênica desse receptor, ocasionada pela infecção com cepa Y de *T. cruzi*, foi a que apresentou a maior indução de RNAm do TLR 2 em todos os momentos e a JLP, a menor. Esses achados devem estar relacionados com a virulência das cepas de *T. cruzi*. Os animais infectados com a cepa Y apresentaram parasitemia inicial tão alta, que a forte indução de TLR 2,

presente em M1, continuou sendo observada em M2, até em maior intensidade. O mesmo não foi notado nos animais infectados com as cepas ZMC e JLP, os quais, com parasitemia mais baixa, também tiveram pouca expressão gênica relativa de TLR 2. Embora não existam trabalhos de outros autores com infecção pelas cepas ZMC e JLP de *T. cruzi*, utilizadas neste estudo, acredita-se que o mesmo processo de ativação celular aconteça, porém de uma maneira menos intensa do que com a infecção causada pela cepa Y.

Roport e Gazzinelli ¹¹³ sugerem que o caminho de sinalização do TLR para a resposta imune inata contra o *T. cruzi*, em especial do TLR 2, tem um papel importante na resposta inicial pró-inflamatória durante a infecção. Vários autores observaram que, na fase inicial da infecção, componentes da membrana do *T. cruzi*, como GPI, GPI-mucina, um subconjunto de GIPL-ceramida e a proteína TC52 estimulam células dendríticas e macrófagos do hospedeiro, via TLR 2, com produção de citocinas pró-inflamatórias e liberação de NO ^{14,17,114,115}. Esses trabalhos confirmam a importância do TLR 2, em especial na fase inicial da infecção pelo *T. cruzi*, encontrados no presente trabalho.

Campos et al.¹⁴ sugerem a participação de receptor diferente do TLR 2 na infecção por *T. cruzi*. Em seu estudo, expressão de RNAm para citocinas, níveis séricos das citocinas, parasitemia e mortalidade em camundongos TLR2^{-/-} infectados não diferiram dos obtidos nos animais controles. Porém, camundongos MyD88^{-/-} foram mais susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi*, com redução na produção de citocinas, sugerindo a participação de outro receptor.

No presente estudo, foi verificada, também, a expressão gênica do TLR 4, outro receptor que, segundo Oliveira et al. ³³, tem capacidade para ativar células do sistema imune, devido à alta concentração de GIPL-ceramida na membrana do

parasita. Os autores observaram que animais TLR 4^{-/-} são mais susceptíveis às infecções pelo *T. cruzi*.

No atual estudo, o aumento importante da expressão gênica relativa do TLR 4, logo após a infecção pelas três cepas de *T. cruzi*, foi de intensidade menor do que o observado para o TLR 2. Dabbagh et al.³⁴ mostraram que o TLR 4 é essencial para o desenvolvimento das respostas associadas ao perfil Th2. Sabe-se que, na infecção chagásica, assim como em infecções por protozoários de maneira geral, a resposta inicial, do perfil Th1, é muito intensa, podendo comprometer a sobrevivência do hospedeiro⁵⁵. A produção de citocinas do perfil Th2 seria uma reação do hospedeiro, modulando o forte efeito pró-inflamatório da infecção. Desta forma, no trabalho ora em discussão, a expressão gênica relativa de TLR 4, que foi mais ou menos constante, ao longo da infecção, teria sido suficiente para modular a resposta Th1 inicial, pela indução de citocinas anti-inflamatórias. Realmente, a presença de expressão gênica da IL-4 e IL-10, observada desde o início da infecção, com aumento significativo a partir da queda do IFN- γ (M4), está de acordo com as sugestões de Dabbagh et al.³⁴ É de se notar, novamente, que a maior expressão gênica de TLR 4 foi observada após infecção pela cepa Y de *T. cruzi*.

Ainda, a menor expressão gênica de TLR2 e TLR 4, no pico da fase aguda da infecção, observada neste trabalho, poderia estar relacionada a mecanismo de retroalimentação negativa, pelas altas concentrações desses receptores ou pela resposta imune produzida.

A IL-12, importante componente da fase inicial da infecção por *T. cruzi*, mostrou-se presente em células esplênicas 24 horas após infecção pelas três cepas de *T. cruzi*. No momento seguinte ao da infecção, aumentou, apenas, para os animais com as cepas Y e ZMC, que também apresentaram o maior número de

parasitas circulantes. Aliberti et al.⁴¹ verificaram que animais tratados com anticorpos anti-IL-12 têm aumento de parasitemia e de mortalidade. Da mesma forma, Une et al.¹¹⁶ em camundongos IL12^{-/-}, infectados com *T. cruzi*, observaram parasitemia alta e mortalidade precoce nos animais.

Assim, neste trabalho, a alta parasitemia dos animais infectados com as cepas Y e ZMC teria levado à maior expressão gênica de IL-12, via TLR. Além de TLR 2 e TLR 4, Shoda et al.¹¹⁷ mostraram, ainda, que DNA de *T. cruzi* pode estimular macrófagos e células dendríticas a expressarem IL-12, TNF- α e NO, via TLR 9.

No presente trabalho, a partir do pico da fase aguda, a infecção pelas três cepas de *T. cruzi* levou à diminuição da expressão gênica da IL-12 pelas células esplênicas, coincidindo com a queda de parasitas circulantes, provocada pela alta e crescente expressão gênica de IFN- γ , desde o momento da infecção. Une et al.¹¹⁸ também encontraram níveis séricos altos dessa citocina, em seu estudo. Para os autores, o aumento da atividade do IFN- γ contribuiria para a limitação da replicação do parasita, até o estabelecimento da resposta imune específica. No presente estudo, a expressão gênica do IFN- γ foi máxima e robusta no momento de maior parasitemia, nos animais infectados com as três cepas de *T. cruzi*. Após a fase aguda, teve início a queda da expressão gênica do IFN- γ , com a diminuição do número de parasitas circulantes e a ascensão da expressão de RNAm de citocinas anti-inflamatórias, efeito visto com maior intensidade nos animais infectados pela cepa Y.

Na infecção pelo *T. cruzi*, além do IFN- γ , o TNF- α também pode induzir altos níveis de óxido nítrico, para o controle da replicação do parasita, na fase aguda da infecção¹¹⁹. Realmente, neste trabalho, o aumento da expressão dessa

citocina coincidiu com o crescimento da parasitemia e foi mais importante nas cepas com maior número de parasitas circulantes e menos intenso na infecção pela cepa JLP, que cursou com número baixo de parasitas circulantes. O controle da parasitemia pelo TFN- α também é sugerido pela queda no número de parasitas observada no início da fase crônica da infecção pelas três cepas de *T. cruzi*. Nesse mesmo sentido, Ronco et al.¹²⁰, utilizando anti-TFN- α , em camundongos infectados, tiveram níveis mais altos de parasitas circulantes.

Portanto, os resultados obtidos neste estudo, assim como os de vários outros autores, mostrou resposta imune do perfil Th1 até o pico da fase aguda, com grande produção de IL-12, IFN- γ e, em menor quantidade, do TNF- α ^{41,42,43,44,45}. Para modular esse forte efeito pró-inflamatório, observou-se a forte expressão gênica das citocinas anti-inflamatórias, capazes de amortecer os efeitos potencialmente lesivos da ativação de macrófagos sobre os tecidos do hospedeiro^{121,122}.

Assim, no trabalho ora em discussão, a expressão gênica de IL-10 foi uma das mais intensas da fase crônica, em especial para os animais infectados com a cepa Y. Nesta fase, notou-se, ainda, diminuição da indução da expressão gênica da IL-12, IFN- γ e, até mesmo, do TNF- α , este último, apenas no momento final do estudo, já antevendo a indução do perfil Th2.

Esses achados estão de acordo com estudos realizados com camundongos IL-10-/-, que tiveram aumento significativo de IFN- γ , NO, TNF- α e IL-12^{123,124}. Além disso, esses animais sucumbiram mais rapidamente à infecção pelo *T. cruzi*, o que é um provável resultado do efeito incontrolado das citocinas pró-inflamatórias, na ausência de IL-10¹²⁴. Hunter et al.¹²⁵, em seu estudo, também mostram o efeito

regulatório negativo da IL-10, pela inibição de IFN- γ , durante a infecção pelo *T. cruzi*.

A expressão gênica da IL-4, a partir da infecção dos camundongos pelas três cepas de *T. cruzi* deste trabalho, foi crescente e paralela à da IL-10, porém, com menor intensidade. Abrahamsohn et al.¹²⁶ não observaram diferenças nos níveis de parasitemia e na mortalidade de camundongos 129/J, BALB/c e C57BL/6, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, IL-4^{-/-}, em relação aos animais selvagens, sugerindo que a produção dessa citocina não tem papel determinante na susceptibilidade à infecção. Hiyama et al.¹²⁷, utilizando camundongos infectados com a cepa Tulahuén de *T. cruzi*, concluem que a IL-4 aumenta a susceptibilidade ao *T. cruzi*, principalmente pela supressão da produção de IFN- γ e NO. Os autores relatam que as diferenças no papel da IL-4, encontradas nos trabalhos, estão relacionadas com as diversas linhagens de *T. cruzi*, as quais têm vasta diversidade genética. Nesse sentido, no trabalho em discussão, não foi observada expressão gênica importante de IL-4 para os animais infectados com a cepa JLP, durante todo o período de infecção. Já, nas cepas Y e ZMC, houve expressão gênica significativa da citocina na fase crônica da infecção, mais intensa, ainda, com a cepa Y.

Observa-se que cepas de *T. cruzi* de origens diversas podem induzir resposta imune de intensidades variadas. Higuchi et al.¹²⁸ sugerem que, dependendo da resposta imune específica, desenvolvida na fase aguda da infecção chagásica, o indivíduo pode apresentar a forma indeterminada ou evoluir para as formas crônicas graves. Dessa forma, cepa de baixa virulência de *T. cruzi*, como a JLP, que suscita resposta imunológica branda, causaria doença de forma clínica benigna, enquanto que cepa virulenta, como a Y ou ZMC, com resposta imune mais robusta, levaria a formas graves, podendo chegar, até mesmo, à morte.

Embora, neste trabalho, não se tenha determinado, diretamente, o nível das citocinas estudadas, mas, sim, sua expressão gênica relativa, pode-se sugerir, com base nos trabalhos de outros autores, demonstrados ao longo desta pesquisa, que a infecção com as três cepas de *T. cruzi* levou ao desenvolvimento do perfil Th1 no início da fase aguda. Ainda se pode inferir, também com apoio dos estudos já apresentados, que, na fase crônica, desenvolveu-se o perfil Th 2, como proteção contra o forte efeito inflamatório inicial. Os receptores *toll* 2 e 4 tiveram, certamente, papel na expressão gênica das citocinas, pelo reconhecimento do parasita, conforme demonstram vários estudos também aqui relatados.

CONCLUSÕES

Para este estudo, são possíveis as seguintes conclusões:

1. As cepas Y, ZMC e JLP, mesmo pertencendo, todas, ao grupo TCII, apresentaram diferentes características biológicas e imunológicas, o que sugere a necessidade de classificação mais adequada.
2. A intensidade de resposta imune pró e anti-inflamatória esteve ligada à virulência, medida pela parasitemia e a evolução da infecção, das cepas utilizadas.
3. A expressão gênica de TLR 2 esteve ligada principalmente à expressão de IL-12 e INF- γ , no início da fase aguda, e a do TLR 4, com a expressão de IL-10, no início da fase crônica, na infecção pelas três cepas do *T. cruzi*.

RESUMO

Receptores *Toll-like* (TLRs), em células apresentadoras de antígenos, têm importante papel no reconhecimento microbiano e no desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Na infecção por *T. cruzi*, a imunidade celular, medida pela atividade de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e IFN- γ , do perfil Th1, associadas ao TNF- α , reduz a carga parasitária na fase crônica. Simultaneamente, a IL-4 e a IL-10, do perfil Th2, são responsáveis por amortecer os fortes efeitos da ação pró-inflamatória. Características do parasita, como variação antigênica e diversidade genética das linhagens de *T. cruzi*, também têm influência na resposta imune do hospedeiro. Assim, este estudo teve como objetivos, em infecção experimental com cepas de diferentes origens de *T. cruzi*: fazer a caracterização molecular das cepas; determinar os momentos evolutivos da infecção (curva de parasitemia e sobrevida) e verificar a expressão gênica relativa de TLR 2, TLR 4, IL-12p40, IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-4 em cada momento da infecção. Para isso, foram utilizadas duas cepas de *T. cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos, ZMC e JLP, e a cepa Y de *T. cruzi*. Camundongos machos Balb/C foram infectados com 10^4 tripomastigotas/animal e distribuídos em: G1, infectados com a cepa Y; G2, infectados com a cepa ZMC; e G3, infectados com a cepa JLP de *T. cruzi*. Os momentos para a determinação da expressão gênica das variáveis estudadas foram definidos segundo curva de parasitemia e de sobrevida previamente realizadas: M1: 24 h p.i.; M2: início da fase aguda; M3: fase aguda; M4: momento da queda importante e de manutenção da parasitemia e M5: momento final, determinado pela curva de sobrevida. Todas as cepas foram classificadas no grupo TCII, apesar de apresentarem comportamentos distintos em relação ao número de

parasitas circulante, dia de pico de fase aguda e taxa de sobrevivência, sendo a virulência de G1>G2>G3. A expressão gênica do TLR 2 e 4 por células esplênicas esteve presente já em M1 em G1, G2 e G3, sendo a do TLR 2>TLR 4. Expressão gênica de IL-12 foi observada nos três grupos, iniciando em M1, com expressão máxima em M2, para G1 e G2. Para o IFN- γ , a expressão gênica aumentou, até M3, com queda acentuada no momento seguinte para G1 (cepa Y). O TNF- α apresentou expressão gradativa em M2 apenas para G1 e em M3 e M4, para G1 e G2. Em relação à IL-4 e à IL-10, não houve expressão gênica em M1, M2 e M3. Para a IL-4, a expressão máxima foi encontrada em M4, apenas para G1 e G2. A IL-10 também teve sua expressão máxima em M4, porém, para os três grupos. A intensidade da expressão da IL-10 foi maior que a da IL-4. A expressão gênica das citocinas e receptores relacionou-se com a parasitemia no hospedeiro (G1>G2>G3), sugerindo que cepas de *T. cruzi* de origens diferentes podem modular a resposta imune na infecção chagásica de diversas maneiras. A alta expressão gênica de IL-12 e IFN- γ coincidiu com a alta expressão de TLR 2, no início da fase aguda, assim como a expressão intensa de IL-10 coincidiu com a do TLR 4, no início da fase crônica, em todos os grupos. Os resultados deste estudo sugerem um papel para os receptores toll 2 e 4, pelo reconhecimento do parasita, na expressão gênica das citocinas.

ABSTRACT

Toll-like receptors (TLRs), in antigen-presenting cells, play an important role in microbial recognition and adaptive immune response development. In *T. cruzi* infection, cellular immunity, mediated by the activity of proinflammatory cytokines such as IL-12 and IFN- γ , of the Th1 profile, associated with TNF- α , reduces parasite load in the chronic phase. Simultaneously, IL-4 and IL-10, of the Th2 profile, are responsible for controlling the strong proinflammatory effects of Th1 profile. Parasite characteristics, such as antigen variation and genetic diversity of *T. cruzi* strains, also influence host immune response. Hence, by using experimental infection with *T. cruzi* strains of different origins, this study aimed at: performing the molecular characterization of the strains; determining the evolutive moments of the infection (parasitemia and survival curve) and analyzing the relative gene expression of TLR 2, TLR 4, IL-12p40, IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IL-4 at each moment of infection. To that end, two *T. cruzi* strains, ZMC and JLP, isolated from chronic chagasic patients, and the Y strain of *T. cruzi* were used. Male Balb/C mice were infected with 10^4 trypomastigotes/animal and distributed into: G1, infected with the Y strain; G2, infected with the ZMC strain; and G3, infected with the JLP of *T. cruzi*. The moments for determination of gene expression of the studied variables were defined according to the curve of parasitemia and survival that was previously performed: M1: 24 h p.i.; M2: beginning of the acute phase; M3: acute phase; M4: moment of important decrease and maintenance of parasitemia and M5: final moment, determined by the survival curve. All the strains were classified in the TCII group although they showed different behaviors in relation to the number of circulating parasites, day of the acute phase peak and survival rate. Virulence was G1>G2>G3.

Gene expression of TLR 2 and 4 by splenic cells was already present at M1 in G1, G2 and G3, and the expression of TLR 2 was more intense than that of TLR 4. Gene expression of IL-12 was already observed in the three groups at M1, with maximum expression at M2 for G1 and G2. However, as to IFN- γ , gene expression increased until M3, but showed a strong reduction at the following moment for G1 (strain Y). TNF- α showed gradual expression at M2 only for G1, and at M3 and M4 for G1 and G2. IL-4 and IL-10 analysis showed no gene expression at M1, M2 or M3. For IL-4, maximum expression was found at M4 only for G1 and G2. IL-10, on the other hand, also showed maximum expression at M4, but for the three groups. IL-10 expression was noteworthy in relation to that of IL-4. The gene expression of cytokines and receptors was related to the number of parasites in the host (G1>G2>G3), thus suggesting that *T. cruzi* strains of different origins can modulate immune response in chagasic infection in several ways. High gene expression of IL-12 and INF- γ agreed with high TLR 2 expression at the beginning of the acute phase, and high IL-10 expression agreed with that of TLR 4 at the beginning of the chronic phase in all groups. These results suggest a role for Toll-2 and Toll-4 receptors in the gene expression of cytokines through parasite recognition.

REFERÊNCIAS*

1. World Health Organization [Internet]. Chagas disease: control and elimination [cited 2010 Jul 15]. Available from: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB124/B124_17-en.pdf.
2. World Health Organization. Chagas disease, Brazil: interruption of transmission. Wkly Epidemiol Rec 2000; 75 (19): 153-6.
3. Aguilar VHM, Abad-Franch F, Racines VJ, Paucar CA. Epidemiology of Chagas disease in Ecuador. A brief review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94 (suppl 1): 387–393.
4. Organizacion Panamericana de la Salud. Estimacion cuantitativa de La enfermedad de Chagas en las Americas [in Spanish]. Montevideo, Uruguay: Organizacion Panamericana de la Salud; 2006.
5. Weekly epidemiological Record, 20 AUGUST 2010, 85th YEAR, No. 34, 2010, 85, 329–336 World Health Organization Geneva.
6. Dias JPC. Epidemiology of Chagas' disease in Brasil. In: Brener R, Stoka AM, editors. Chagas` disease vectors. Boca Raton: CRC Press; 1987. v.1, p.57-81.
7. Schmunis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. Transfusion. 1991; 31:547-57.
8. Vinhaes MC, Dias JCP. Doença de Chagas no Brasil. Cad Saúde Pública. 2000; 16:7-12.
9. Dias JCP. Doença de Chagas, ambiente, participação e Estado. Cad Saúde Pública. 2001; 17:165-9.
10. Ribeiro ALP, Rocha MOC. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. Rev Soc Bras Med Trop. 1998; 31:301-14.
11. Andrade Z, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.171-6.

*International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Ann Inter Med 1997; 126:36-47.

National Livrary of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2001. 248p.

12. Brodskyn CI & Barral-Netto M 2000. Resposta imune humana na doença de Chagas. In: Brener Z, Tarleton RI. Parasite persistence in the actiology of Chagas disease. Int J Parasitol 2001; 31: 550-4.
13. Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 2006; 177:3515-9.
14. Campos MA, Closel M, Valente EP, Cardoso JE, Akira S, Alvarez-Leite JI, et al. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. The Journal of Immunol 2004; 172: 1711-8.
15. Kaisho T, Akira S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor and MyD88-knockout mice. Trends Immunol 2001; 22: 78-83.
16. Dabbagh K, Lewis DB. Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses. Curr Opin Infect Dis 2003; 16: 199-204.
17. Campos MA, Gazzinelli RT. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. Mediators of Inflammation 2004; 13(3):139-43.
18. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. Trends Parasitol 2002; 18: 262.
19. Koop EB, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control. of innate immunity. Curr Opin Immunol 1999; 11: 13-8.
20. Akashi-Takamura S, Miyake K. Toll-like receptors (TLRs) and immune disorders. J Infect Chemother 2006; 12: 333-40.
21. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda y, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. J Immunol 1999; 162: 3749.
22. Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. J Biol Chem 1999; 274: 33419.
23. Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, et al. Preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-

- activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 2000; 164: 554.
24. Campos MAS, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procópio DO, et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 2001; 167: 417-23.
 25. McConville MJ, Ferguson MA. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J* 1993; 294: 305.
 26. Procópio DO, Almeida IC, Torrecilhas ACT, Cardoso JE, Teyton L, Travassos LR, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins from *Trypanosoma cruzi* bind to CD1d but do not elicit dominant innate or adaptive immune responses via the CD1d/NKT cell pathway. *J Immunol* 2002; 169: 3926-33.
 27. Golgher DB, Colli W, Souto-Padron T, Zingales B. Galactofuranose-containing glycoconjugates of epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 60: 249.
 28. Almeida IC, Gazzinelli RT. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analysis. *J. Leukocyte Biol* 2001; 70: 476.
 29. Ropert C, Gazzinelli RT. Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 2000; 3:395.
 30. Camargo MM, Almeida IC, Pereira MES, Ferguson MAJ, Travassos LR, Gazzinelli RT. GPI-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of pro-inflammatory cytokines by macrophages. *J Immunol* 1997; 158: 5890-1.
 31. Almeida IC, Camargo MM, Procópio DO, Silva LS, Mehler A, Travassos LR, et al. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *EMBO J* 2000; 19:1476.
 32. Ropert C, Almeida IC, Closel M, Travassos LR, Ferguson MAJ, Cohen P, et al. Requirement of mitogen-activated protein kinases and I κ B phosphorylation for induction of proinflammatory cytokines synthesis by macrophages indicates functional similarity of receptors triggered by glycosylphosphatidylinositol anchors from parasitic protozoa and bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001; 166: 3423-21.

33. Oliveira C, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. J Immunol 2004; 173: 5688 -96.
34. Dabbagh K, Dahl ME, Stepick-Biek P, Lewis DB. Toll-like receptor 4 is required for optimal development of TH2 immune response: role of dendritic cells. J Immunol 2002; 168: 4524-30.
35. Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. J Clin Invest 2002; 109: 1351-59.
36. Re F, Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. J Biol Chem 2001; 376:92-9.
37. Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10: the role of NK cells. Infect Immun. 1996; 64:128-34.
38. Minoprio PM, Eisen H, Joskowicz M, Pereira P, Coutinho A. Suppression of polyclonal antibody production in murine *Trypanosoma cruzi* infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. J Immunol. 1987; 139:545-50.
39. Tarleton RL. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. J Immunol. 1990; 144:717-24.
40. Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M. Susceptibility of beta-2-microglobulin-deficient mice of *Trypanosoma cruzi* infection. Nature. 1992; 356: 338-40.
41. Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by macrophages in response to live trypomastigotes. Infect Immun. 1996; 64:1961-7.
42. Hunter CA, Slifer T, Araújo F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. Infect Immun. 1996; 64:2381-6.
43. Michailowsky V, Silva MN, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma in controlling tissue

- parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Pathol. 2001; 159:1723-33.
44. Kumar S, Tarleton L. Antigen specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. J Immunol. 2001; 166:4596-603.
 45. Nabors GS, Tarleton RL. Differential control of IFN- γ and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 1991; 146:3591-8.
 46. Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler MK, Andreson D, Reed SG. Interleukin-10 and interferon- γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J Exp Med. 1992; 175:169-74.
 47. Ortiz-Ortiz L, Ortega T, Capin R, Martinez T. Enhanced mononuclear phagocytic activity during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Int Arch Allergy Appl Immunol. 1976; 50:232-42.
 48. Torrico F, Heremans H, Rivera MT, Van Marck E, Billiau A, Carlier Y. Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. J Immunol. 1991; 146:3626-32.
 49. Michailowsky V, Murta SMF, Carvalho-Oliveira L, Pereira MES, Ferreira LRP, Brener Z, et al. Interleukin-12 enhances in vivo parasitocidal effect of benzidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42(10):2549-56.
 50. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. Infect Immun. 2003; 71:1185-93.
 51. Abrahamsohn IA, Coffman R. Cytokine and Nitric Oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 1995; 155:3955-63.
 52. Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon- γ and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Pathol. 2001; 158:1433-40.
 53. Abrahamsohn IA. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi*. Bras J Med Biol Res. 1998; 31:117-21.

54. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12:635-73.
55. Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997; 114:103-10.
56. Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James S, Sher A. The microbicidal activity of interferon- γ treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- α . *Eur J Immunol.* 1992; 22:2501-6.
57. Dutra WO, Gollob KJ, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, Coffman RL, et al. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. *Scand J Immunol.* 1997; 44:74-80.
58. Belkaid Y. Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. *Eur J Immunol.* 2008; 38:918-21.
59. Kotner J, Tarlenton R. Endogenous CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun.* 2007; 75:861-9.
60. Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Massara RL, Borges JD, Lage OS, Lana M, et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural Killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4⁺CD25⁺ high T cells balancing activated CD8⁺T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol.* 2006; 145:81-92.
61. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3:253-7.
62. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001; 2: 861-22.
63. Shevach EM. CD24⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answer. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 389-400.
64. Trzonkowski P, Szmit E, Mysliwska J, Dobyszyk A, Mysliwski A. CD4⁺cd25⁺ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD4⁺ and NK Lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol.* 2004; 112:258-67.

65. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005; 6:1133-41.
66. Guedes PMM, Gutierrez FRS, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLOS Neglected Trop Dis.* 2010; 16:4(2):e604.
67. Umekita LF, Mota I. How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*? *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33:253-8.
68. Cordeiro FD, Martins-Filho AO, Rocha MOC, Adad SJ, Corrêa-Oliveira R, Romanha AJ. Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas disease. *Clin Diag Lab Immun.* 2001; 8:112-8.
69. Martins LPA, Castanho REP, Rosa JA, Silva LC, Godoy CAP, Rosa RM. Caracterização biológica, histopatológica e análise de ácido nucléico de uma cepa *Trypanosoma cruzi* da região de Marília, SP. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36(1): 35-9.
70. Steindel M, Dias Neto E, Menezes CLP, Romanha AJ, Simpson AJG. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 60:71-80.
71. Teixeira AR, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA. Chagas disease. *Postgrad Med J.* 2006; 82(974):788-98.
72. Coura JR. Origem, determinantes e morbidade da Doença de Chagas. *Salus* 2007; 11:62-6.
73. Fernandes O, Santos SS, Junqueira ACV, Jansen AM, Cupolillo E, Campbell DA, et al. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94(Supl I): 1995-7.
74. Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequences. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 62:45-52.
75. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996; 83:141-52.

76. Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Brines MRS. Epidemiology, Biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(Supl I):159-64.
77. Momen H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94:181-4.
78. Macedo AM, Pimenta JR, Aguiar RS, Melo AIR, Chiari E, Zingales B, et al. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96: 407-13.
79. Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SDJ. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99:1-12.
80. Fernandes O, Souto RP, Castro JA. Triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. Am J Trop Med Hyg. 1998; 58(6):807-11.
81. Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SMR, et al. Ancestral genomes, sex and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathog. 2006; 2:e24.
82. Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, Levin MJ, et al. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. Int J Parasitol. 2008; 38:1533-43.
83. Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Int J Parasitol. 2000; 30:35-44.
84. Picka MCM, Meira DA, de Carvalho TB, Peresi E, Marcondes-Machado J. Definition of a diagnostic routine in individuals with inconclusive serology for Chagas disease. Braz J Infect Dis. 2007; 11(2):226-33.
85. Fernandes O, Santos SS, Cuplollillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira ACV, et al. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 2001; 95:97-9.
86. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1962; 4:398-6.

87. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001; 25:402-8.
88. Beck JA, Lloyd S, Hafezparasat M, Pierce ML, Eppig JT, Festing FW, et al. Genealogies of inbred strains. *Nat Genet*. 2000; 24:23-5.
89. Andrade SG, Carvalho ML, Figueira RM. Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Gaz Med Bahia*. 1970; 70:32-42.
90. Brener Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1965; 59:19-26.
91. Brener Z, Golgher RR, Bertelli MSM, Teixeira RJ. Strain-dependent thermosensitivity influencing intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi* in cell culture. *J Protozool*. 1976; 23:147-50.
92. Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77:6810-4.
93. Andrade SG, Magalhães JB. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and an experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997; 30:27-35.
94. Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, et al. Molecular epidemiology of american trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol*. 1998; 28:105-12.
95. Lages-Silva E, Ramírez LE, Pedrosa AL, Crema E, Galvão LMC, Pena SDJ. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:2167-71.
96. Fernandes CD, Murta SMF, Cerávolo IP, Krug LP, Vidigal PG, Steindel M, et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997; 92:343-51.

97. Oliveira EC, Stefani MM, Campos DE, Andrade AL, Silva SA, Rassi A, et al. *Trypanosoma cruzi* stocks isolated from acute Chagas disease patients lead to lethal murine infection. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1997; 91:25-7.
98. Silva MA, Nai GA, Rosa JA. Caracterização biológica e molecular de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes na fase crônica, forma cardíaca da doença de chagas. Rev Patol Trop. 2006; 35(3):213-26.
99. Andrade SG. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. Rev Patol Trop. 1974; 3:65-121.
100. Bice DE, Zeledon R. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). J Parasitol. 1970; 56:663-70.
101. Magalhães JB, Andrade SG, Sherlock I. *Trypanosoma cruzi* strains: behavior after passage into autochthonous or foreign species of triatomines (biological and biochemical patterns). Rev Inst Med Trop São Paulo. 1996; 38:23-8.
102. Silva LHP, Nussenzweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clin Biol. 1953; 20:191-208.
103. Espinoza TR, Sosa S, Oaxaca E, Vizcaino-Castillo A, Caballero ML, Martinez I. Mexican *Trypanosoma cruzi* T. cruzi I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. B. J Biomed Biotechnol. 2010; ID890672:1-10.
104. Breniere SF, Bosseno MF, Telleria J, Bastrenta B, Yacsik N, Noireau F, et al. Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young bolivian patients. Exp Parasitol. 1998; 89:285-95.
105. Solari A, Campillay R, Ortiz S, Wallace A. Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. Exp Parasitol. 2001; 97:226-33.
106. Barnabé C, Neubauer K, Solari A, Tibayrenc M. *Trypanosoma cruzi*: presence of the two major phylogenetic and several lesser discrete typing units (DTUs) in Chile. Acta Trop 2001; 78:127-37.
107. Diosque P, Barnabé C, Padilla A, Marco J, Cardozo R, Cimino R, et al. Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. Int J Parasitol. 2003; 33:997-1003.

108. Virreira M, Serrano G, Maldonado L, Svoboda M. *Trypanosoma cruzi*: typing of genotype (sub) lineages in megacolon samples from bolivian patients. Acta Trop. 2006; 100(3):252-5.
109. Valadares HM, Pimenta JR, de Freitas JM, Duffy T, Bartholomeu DC, Oliveira RP, et al. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellite. Int J Parasitol. 2008; 38(7):839-50.
110. Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, Almeida IC, Frasch ACC. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. J Exp Méd. 2002; 195:401-13.
111. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends *T. cruzi* I to *T. cruzi* VI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104:1051-4.
112. Dosreis GA, Ribeiro-Gomes FL, Guillermo LV, Lopes MF. Cross-talk between apoptosis and cytolines in the regulation of parasitic infection. Cytokine Growth Factor Rev., v18, p.97-105, 2007
113. Ropert C, Gazzinelli RT. Regulatory role of toll-like receptor 2 during infection with *Trypanosoma cruzi*. J Endotoxin Res 2004; 10:425-30.
114. Previato JO, Wait R, Jones C, DosReis GA, Todeschini AR, Heise N, et al. Glycoinositolphospholipid from *Trypanosoma cruzi*: structure, biosynthesis and immunobiology. Adv Parasitol. 2004; 56:1-41.
115. Ouaisi A, Guilvard E, Delneste Y, Caron G, Magistrelli G, Herbault N, et al. Infection confers protection against lethal signals via toll-like receptor 2, and human dendritic cell maturation, Tc52-released protein induces the *Trypanosoma cruzi*. J Immunol. 2002; 168:6366-74.
116. Une C, Andersson J, Örn A. Role of IFN- α/β and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon- γ production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. Clin Exp Immunol. 2003; 134:195-201.
117. Shoda LK, Kegerreis KA, Suarez CE, Roditi I, Corral RS, Bertot GM, et al. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor, and nitric oxide. Infect Immun. 2001; 69:2162-71.

118. Une C, Andersson J, Eloranta ML, Sunnemark D, Harris RA, Örn A. Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity and induction of NK cell-derived interferon-gamma (IFN- γ) display different kinetics during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. Clin Exp Immunol. 2000; 121(3):499-505.
119. Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. Infect Immun. 1995; 63:4862-7.
120. Ronco MT, Francés DE, Ingaramo PI, Quiroga AD, Alvarez ML, Pisani GB, et al. Tumor necrosis factor alpha induced by *Trypanosoma cruzi* infection mediates inflammation and cell death in the liver of infected mice. Cytokine. 2010; 49:64-72.
121. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. J Immunol. 1991; 146(10):3444-51.
122. Adorini, L. Cytokine-based immunointervention in the treatment of autoimmune diseases. Clin Exp Immunol. 2003; 132:185-92.
123. Abrahamsohn IA, Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF- α , IFN- γ and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. Exp Parasitol. 1996; 84:231-44.
124. Hölscher C, Mohrs M, Dai WJ, Köhler G, Ryffel B, Schaub GA, et al. Tumor Necrosis Factor Alpha-Mediated Toxic Shock in *Trypanosoma cruzi*-Infected Interleukin 10-Deficient Mice. Infect Immun. 2000; 68:4075-83.
125. Hunter CA, Ellis-Neyes LA, Slifer T, Kanaly S, Grunig G, Fort M, et al. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. J Immunol. 1997; 158:3311-6.
126. Abrahamsohn IA, da Silva AP, Coffman RL. Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. Infect Immun. 2000; 68:1975-9.
127. Hiyama K, Hamano S, Nakamura T, Nomoto K, Tada I. IL-4 reduce resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection. Parasitol Res. 2001; 87:269-74.

128. Higuchi ML, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res* 2003; 60: 96-107.

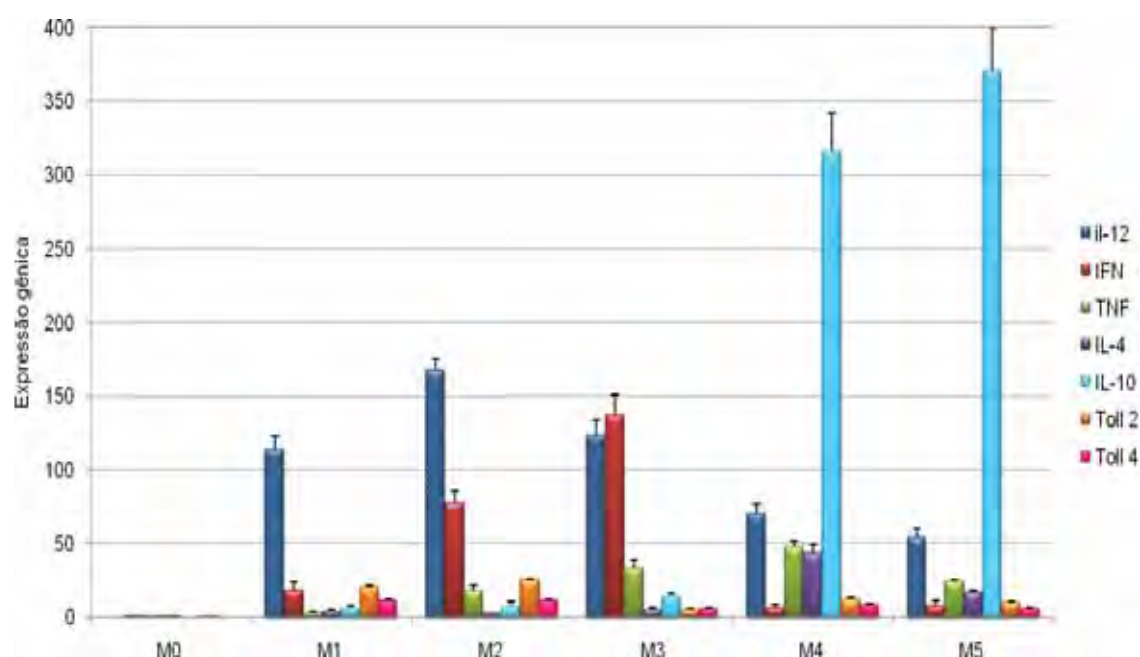
APÊNDICE 1

Momentos em que foram determinadas as expressões gênicas das citocinas e receptores *toll* pela infecção pelas cepas Y, ZMC e JLP de *T. cruzi*.

Cepas <i>T. cruzi</i> Momentos	M0	M1	M2	M3	M4	M5
Cepa Y	Pré-infecção	4 h	6 dias	7 dias	9 dias	19 dias
Cepa ZMC	Pré-infecção	4 h	9 dias	26 dias	57 dias	90 dias
Cepa JLP	Pré-infecção	4 h	11 dias	14 dias	28 dias	123 dias

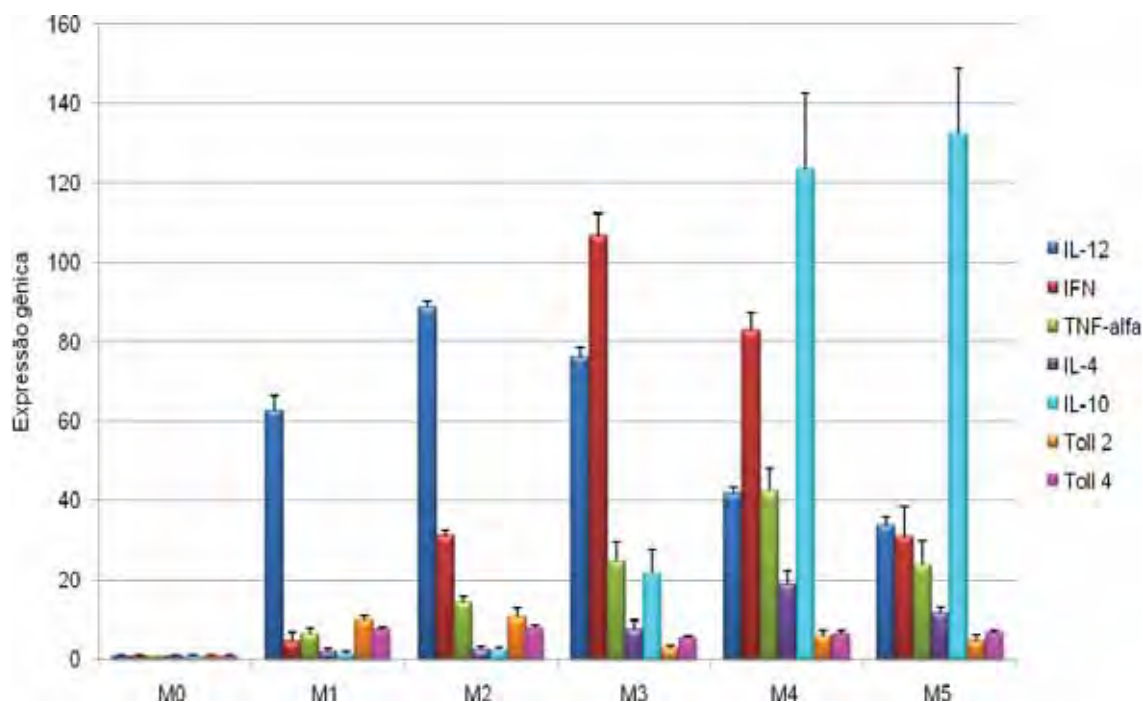
APÊNDICE 2.

Expressão gênica dos TLR 2 e 4 e das citocinas IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 nos diferentes momentos da evolução da infecção experimental pela cepa Y de *T. cruzi* (G1). M0: sem infecção; M1: 24h p.i.; M2: início fase aguda; M3: pico fase aguda; M4: início fase crônica; M5: fase crônica antes da morte. Amostras de três animais, em cada momento, foram analisadas em duplicata pela PCR em tempo real. Os valores foram normalizados pela expressão da β -actina em cada amostra e comparados aos controles, sem infecção.



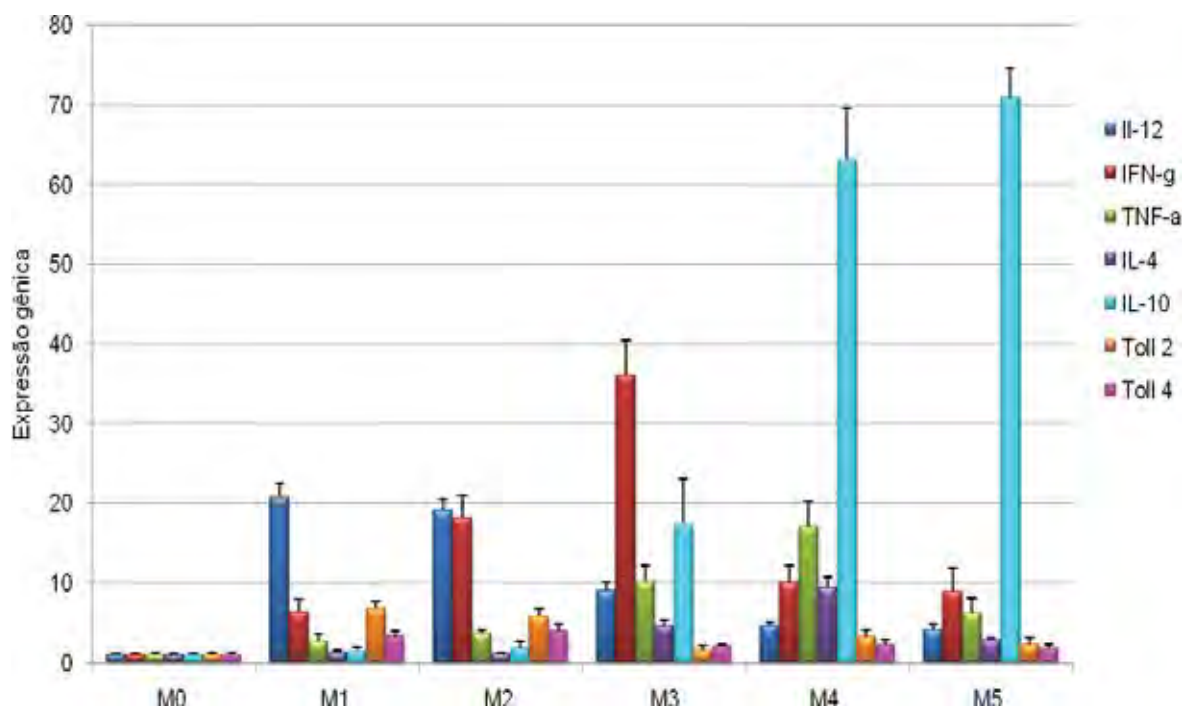
APÊNDICE 3

Expressão gênica dos TLR 2 e 4 e das citocinas IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 nos diferentes momentos da evolução da infecção experimental pela cepa ZMC de *T. cruzi* (G2). M0: sem infecção; M1: 24h p.i.; M2: início fase aguda; M3: pico fase aguda; M4: início fase crônica; M5: fase crônica antes da morte. Amostras de três animais, em cada momento, foram analisadas em duplicata pela PCR em tempo real. Os valores foram normalizados pela expressão da β -actina em cada amostra e comparados aos controles, sem infecção.



APÊNDICE 4

Expressão gênica dos TLR 2 e 4 e das citocinas IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 nos diferentes momentos da evolução da infecção experimental pela cepa JLP de *T. cruzi* (G3). M0: sem infecção; M1: 24h p.i.; M2: início fase aguda; M3: pico fase aguda; M4: início fase crônica; M5: fase crônica antes da morte. Amostras de três animais, em cada momento, foram analisadas em duplicata pela PCR em tempo real. Os valores foram normalizados pela expressão da β -actina em cada amostra e comparados aos controles, sem infecção.



ANEXO 1



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.

CEP: 18.618-970

Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143

e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 581 sobre o Projeto de Pesquisa “Relação dos receptores toll-like 2 e 4 com a produção de citocinas e anticorpos em infecção experimental e em doentes com infecção crônica pelo T. cruzi”, sob a responsabilidade da Profª. Drª. Jussara Marcondes Machado, com a participação de Mariele Cristina Modolo Picka, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os ratos são provenientes de biotério convencional, sem condições de emitir Atestado de Sanidade.

Projeto de Pesquisa Aprovado em 29 de novembro de 2.006

Profª Drª Norma Sueli P. Modolo
Presidente da CEEA

Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

ANEXO 2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



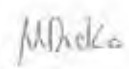
Fis.	
Proc.	
Rub.	

JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO NO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

Declaramos que o Projeto de Pesquisa **"Expressão de RNAm para TLR2, TLR4 e citocinas em relação à produção de anticorpos na infecção experimental e em indivíduos com infecção crônica pelo *Trypanosoma cruzi*"**, aprovado pelo CEP em 29/11/06, teve seu título alterado para **"Expressão gênica relativa de receptores toll-like 2 e 4 e citocinas em infecção experimental por cepas de *Trypanosoma cruzi* em diferentes origens"**, sem nenhuma alteração no seu conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

A presente alteração foi efetuada somente para adequação do título da Tese de Doutorado.

Botucatu, 08/11/2010

Nome/Assinatura do(a) aluno(a) **Mariele Cristina Modolo Picka** 

Nome/Assinatura do(a) orientador (a) **Prof^a. Dr^a. Jussara Marcondes Machado** 

Programa de Pós Graduação em Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem

OBS.: Preencher formulário em 2 vias e protocolar na respectivo CEP

13839 1011 / 2010 000000 COMITE DE ETICA 51 15/02/2010 13:13 - 15/02

ANEXO 3



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Laboratório de Investigação Médica-Parasitologia LIM 46
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 500 1º andar sala 20 CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (11) 3066-7041/7042 Fax: 3066-7042

São Paulo, 30 de maio de 2007.

DECLARAÇÃO

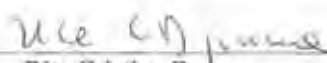
Informo estar doando três cepas de *Trypanosoma cruzi* provenientes de pacientes do Instituto do Coração (Incor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) a Mariele Cristina Modolo Picka do laboratório de pesquisa de doenças tropicais (UNESP).

Pacientes:

- JLP (data de entrada no laboratório: 17/10/06)
- VMS (data de entrada no laboratório: 10/01/07) *Não utilizada*
- ZMC (data de entrada no laboratório: 28/03/07)

Sem mais

Atenciosamente


Rita Cristina Bezerra


Mariele Cristina Modolo Picka