

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA CLÍNICA  
MODALIDADE IMUNOLOGIA**

**Interação do *Trypanossoma cruzi* com células da  
resposta imune inata**

**RONALDO RODRIGUES SARMENTO  
UBERABA-MG, 2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**  
**FACULDADE MEDICINA DO TRIÂNGULO MINEIRO**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA CLÍNICA**  
**DISCIPLINA DE IMUNOLOGIA**

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

Coordenadora do Curso de Pós-graduação: Prof. Dra. Roseli Aparecida Silva

**RONALDO RODRIGUES SARMENTO**

**Interação do *Trypanosoma cruzi* com células da  
resposta imune inata**

Dissertação de Mestrado apresentada como  
requisito à obtenção do grau de mestre em  
Patologia Clínica, Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro.

Programa de Pós-Graduação em Patologia

**Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior**

**Co-Orientadora: Dr. Karine Rezende de Oliveira**

Área de Concentração: Imunologia

**UBERABA-MG**

2008  
RONALDO RODRIGUES SARMENTO

## **Interação do *Trypanosoma cruzi* com células da resposta imune inata**

Dissertação de Mestrado apresentada como  
requisito à obtenção do grau de mestre em  
Patologia Clínica, Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro.

Programa de Pós-Graduação em Patologia

**Orientador: Prof. Dr. Virmondés Rodrigues Junior**

**Co-Orientadora: Dr. Karine Rezende de Oliveira**

Área de Concentração: Imunologia

Aprovada em :

BANCA EXAMINADORA

---

**Prof. Dr. Virmondés Rodrigues Junior**

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

**Profa. Dra. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso**

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

**Profa. Neide Maria da Silva**

Universidade Federal de Uberlândia

---

**Profa. Dra. Roseli Aparecida da Silva Gomes**

## Ficha Catalográfica

Sarmiento, Ronaldo Rodrigues

Interação do *Trypanosoma cruzi* com células da resposta imune inata/ Ronaldo Rodrigues Sarmiento- Uberaba: UFTM/ Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2008.

xiii, 66f.: il.; 31cm.

Orientador: Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

Co-orientadora: Dr. Karine Rezende de Oliveira

Dissertação (mestrado) – UFTM / Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2008.

Referências bibliográficas: f. 55-64.

1. Doença de Chagas imunidade inata 2. – Citocinas e quimiocinas. – Tese. I.

Rodrigues Junior, Virmondes, De Oliveira, Karine Rezende II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Imunologia III. Título.

## **DEDICATÓRIAS**

Dedico este trabalho

Especialmente ao Dr. Virmondés Rodrigues Júnior e a Karine Rezende de Oliveira meus amigos que contribuíram para meus conhecimentos na área de Imunologia.

À minha querida namorada Ana Carolina, por ser uma pessoa maravilhosa e companheira, sempre presente durante toda a realização deste trabalho e também por seu amor, amizade e apoio incondicional, mesmo nos momentos mais difíceis.

Os meus amados pai e mãe Tito e Elizeth, pelo carinho, amor, bravura e dedicação. Duas pessoas, sem igual que, não só me deram a vida, como me fizeram a pessoa que sou.

Aos meus irmãos Fabiano, Renato e Fernando pela amizade, apoio e compreensão (apesar de tantas brigas passadas).

Aos meus professores de todas as épocas da vida.

Aos amigos e amigas que me ajudaram de qualquer forma.

Aos colegas do laboratório PADRÃO e da UNIUBE.

E acima de tudo a Deus.

Às pessoas que sempre me deram forte para seguir em frente e conquistar mais um desafio.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior meu orientador e amigo que sem a presença dele constante nunca conseguiria chegar a mais este objetivo de vida, é um exemplo a ser seguido em todos os seus atos, caráter e competência. Que, durante todo o tempo, foi um verdadeiro orientador, por sua paciência (muita), competência e amizade;

À Prof.a. Dra. Karine Rezende de Oliveira minha co-orientadora pelos ensinamentos, ajuda, amizade e fundamental apoio em todos os momentos do trabalho realizado;

Aos Funcionários e Pós-Graduandos da disciplina de Imunologia e Patologia Clínica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pela ajuda nas dosagens, assim como a amizade de todos;

À Seção de Pós-Graduação em Patologia Clínica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM);

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), pela estrutura e pelos Professores sempre importantes em todos os momentos;

Agradecemos a Deus e a nossos todos familiares e todos os amigos que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho e no crescimento profissional.



## RESUMO

### "Interação do *Trypanosoma cruzi* com células da resposta imune inata."

A resposta imune inata é o primeiro mecanismo de proteção contra o *Trypanosoma cruzi*. A interação de células inflamatórias com moléculas do parasito pode modular a resposta imune inata adaptativa. O objetivo deste trabalho foi analisar o papel desempenhado por citocinas e quimiocinas sintetizadas pelas células do sangue total e células mononucleares (PBMC), após interação com tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. Formas tripomastigotas da cepa Y foram obtidas a partir de células VERO mantidas em cultura. O sangue de 16 indivíduos soronegativos para a doença de Chagas foi colhido e processado para cultura. PBMCs foram separados utilizando Ficoll-Hipaque. Após a separação, as células foram infectadas com tripomastigotas e incubadas por 24 horas para posterior coleta do sobrenadante. Citocinas (IL-12, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas (RANTES, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  e MIG) foram avaliadas por ELISA. Níveis de nitrito foram detectados utilizando método de Griess. A produção de IL-10 foi significativamente maior pelas células do sangue total em relação às células mononucleares ( $p < 0,05$ ). Entretanto, não houve diferença estatística quanto aos níveis de IL-12 e TNF- $\alpha$  produzidos pelos dois grupos de células. Células do sangue total sintetizaram altos níveis de RANTES, Mig, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  e nitrito comparado aos níveis detectados nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares, havendo aumento significativo dos níveis de IL-10, TNF- $\alpha$  e Mig sintetizados por aquelas células ( $p < 0,05$ ). Estes dados sugerem que monócitos e neutrófilos agem de forma distinta quando estimulados com tripomastigotas. Estas diferenças podem influenciar nos eventos iniciais da imunidade anti-*T. cruzi*, bem como na modulação da resposta imune adaptativa. O evento final dependerá das propriedades biológicas de cada molécula e a interação entre elas.

**Palavras-chaves:** Trypanosoma cruzi; quimiocinas; citocinas; resposta imune inata

## ABSTRACT

The Innate Immune Response is the first mechanism of protection against *Trypanosoma cruzi*. Interaction of inflammatory cells with parasite molecules tiger trypanocidal molecules and regulation products that modulate adaptive immune response. The objective: this work analyzed the role developed by proteins synthesized for the whole blood cells (WBC) and mononuclear cells (PBMC) after interaction with trypomastigotes of Y strain of *T. cruzi*. Material and Methods: Trypomastigotes of Y strain were obtained from VERO cells maintained in RPMI-1640 supplemented. The blood of 16 seronegatives individuals for Chagas' disease was harvest and processed to culture. PBMCs were separated by Ficoll-Hipaque gradient. After resuspension in the same medium, they were plated in 24-well plates and cultured with medium alone or 5 parasites/cell for 24 hours. Then, supernatants were collected. Cytokines (IL-12, IL-10 and TNF- $\alpha$ ) and chemokines (RANTES, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  e Mig) were measured by ELISA. Nitric Oxide (NO) was determined by Griess' method. The absorbance was read at 540 nm. Results were analyzed with Statview for windows, Mann-Whitney and Wilcoxon test. Differences were considered statistically significant at  $P$  values  $< 0,05$ .

Results: Interleukin-10 was produced at high levels by WBC compared with PBMC. WBC produced significant high levels of IL-10 after incubation with trypomastigotes. Production of TNF- $\alpha$ , was significant higher on both PBMC and WBC after addition of trypomastigotes. Significant increase in the levels of IL-12 production was observed only on PBMCs after *T. cruzi* stimulation.

Determination of the levels of chemokines produced by PBMCs and WBC in the presence or the absence of trypomastigotes

Addition of trypomastigotes in the cells' culture induced increase of the MIG's levels produced on WBC. The presence of trypomastigotes in the culture of PBMC or WBC did not induce significant increase in the production of RANTES, MCP-1 and MIP-1  $\alpha$ .

Nitrite levels in culture of PMBC and WBC in the presence or absence of trypomastigotes  
Mononuclear cells and WBC did not produce significant levels of nitrite in the presence of trypomastigotes. However, when analyzing the nitrite's levels produced by PBMC of each individual, it is observed that addition of the parasite in the culture can induced a increasing in the levels produced by this cells. Conclusion: Surface's molecules of the *T. cruzi* can be inducing the production of cytokines and chemokines by cells of the innate immune response probably through the activation of Toll-Like Receptors (TLR).

The ability to induce IL-12 and TNF- $\alpha$  may contribute to the direction of adaptive immune response toward to Th1.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
SUMÁRIO .....	X
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	XI
LISTA DE FIGURAS .....	XIII
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1. 1. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	13
1. 2. Aspectos da doença de Chagas.....	14
1. 3. O processo de adesão e invasão do parasito.....	17
1. 4. Fatores do hospedeiro envolvidos no controle da infecção e na patogênese da doença de Chagas.....	20
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
2.1- Objetivos Gerais .....	30
2.2- Objetivos Específicos .....	30
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>31</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
4.1. Obtenção dos parasitos.....	32
4.2. Obtenção e cultivo de células para coleta de sobrenadante.....	32
4.3. Ensaio Imunoenzimático.....	34
4.4. Dosagem de Óxido Nítrico .....	35
4.5. Análise estatística .....	35
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>51</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>71</b>

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

**DAF** Fator de decaimento da aceleração

**fMLP** - N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-pnenylalanine

**GM-CSF** - granulocyte macrophage-colony stimulating factor

**IkB** - Inhibitor of NF-kB kinase

**IFN**- Interferon

**IL**- Interleucinas

**IL1-ra** - IL-1 recetor antagonist

**IRAKs** - IL-1 receptor-associated kinases

**IFN- $\gamma$**  – interferon gama

**IRF3** – interferon regulatory factor 3

**MAC** - Complexo de ataque à membrana

**MAP quinases** – mitogen-activated protein quinases

**MyD88** – Fator de diferenciação mieloide 88

**NADPH-oxidase** - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

**NO**- óxido nítrico

**PMAPs** - padrões moleculares associados a patógenos

**TIRAP** - TIR adapter protein

**TLR** – Toll-like receptor

**CHP** – Complexo de histocompatibilidade principal

**CSFs** – Fatores estimuladores de colônias

**HLA** – Antígeno leucocitário de histocompatibilidade

**IL-12** – Interleucina doze

**IL-10** – Interleucina dez

**LPS** – Lipopolissacarídeos

**MIP** – Proteína inflamatória de macrófagos

**NO** – Óxido nítrico

**NOS** – Sintase do óxido nítrico

**PBS** – Tampão Fosfato Salino

**RANTES**- Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted  
(Regulamenta e ativa as células T , Normal Expresso e secretadas)

**RNA** – Ácido Ribonucléico

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

**Th1** – Linfócito T auxiliar do tipo um

**Th2** – Linfócito T auxiliar do tipo dois

**Th3** – Linfócito T auxiliar do tipo três

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

**UFTM** – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 01</b> - Ciclo evolutivo da doença de Chagas.....	14
<b>FIGURA 02</b> - Níveis de IL - 12 produzidas por leucócitos e células mononucleares de indivíduos soro negativos para Doença de Chagas, 18 horas após a infecção com as formas tripomastigotas.....	37
<b>FIGURA 03</b> - Níveis de IL - 10 produzidas por leucócitos e células mononucleares de indivíduos soro negativos para Doença de Chagas, 18 horas após a infecção com tripomastigotas.....	38
<b>FIGURA 04</b> - Níveis do TNF- $\alpha$ produzidas por leucócitos e células mononucleares de indivíduos soro negativos para Doença de Chagas, 18 horas após a infecção com tripomastigotas.....	39
<b>FIGURA 05</b> - Comparação entre os níveis de MIG produzidas por leucócitos e células mononucleares de indivíduos soro negativos para Doença de Chagas, 18 horas após a infecção com tripomastigotas.....	40
<b>FIGURA 06</b> - Comparação entre os níveis de RANTES produzidas por leucócitos e células mononucleares de indivíduos soro negativos para Doença de Chagas, 18 horas após a infecção com tripomastigotas.....	41
<b>FIGURA 07</b> - Comparação entre os níveis de MIP-1 $\alpha$ produzidas por leucócitos e células mononucleares de indivíduos soro negativos para Doença de Chagas, 18 horas após a infecção com tripomastigotas.....	42
<b>FIGURA 08</b> - Comparação entre os níveis de MCP-1 produzidas por leucócitos e células mononucleares de indivíduos soro negativos para Doença de Chagas, 18 horas após a infecção com tripomastigotas.....	43
<b>FIGURA 09</b> - Comparação entre os níveis de nitrito produzidos por leucócitos e células mononucleares de indivíduos soro negativos para Doença de Chagas, 18 horas após a infecção com tripomastigotas.....	44

# 1 INTRODUÇÃO

---

2

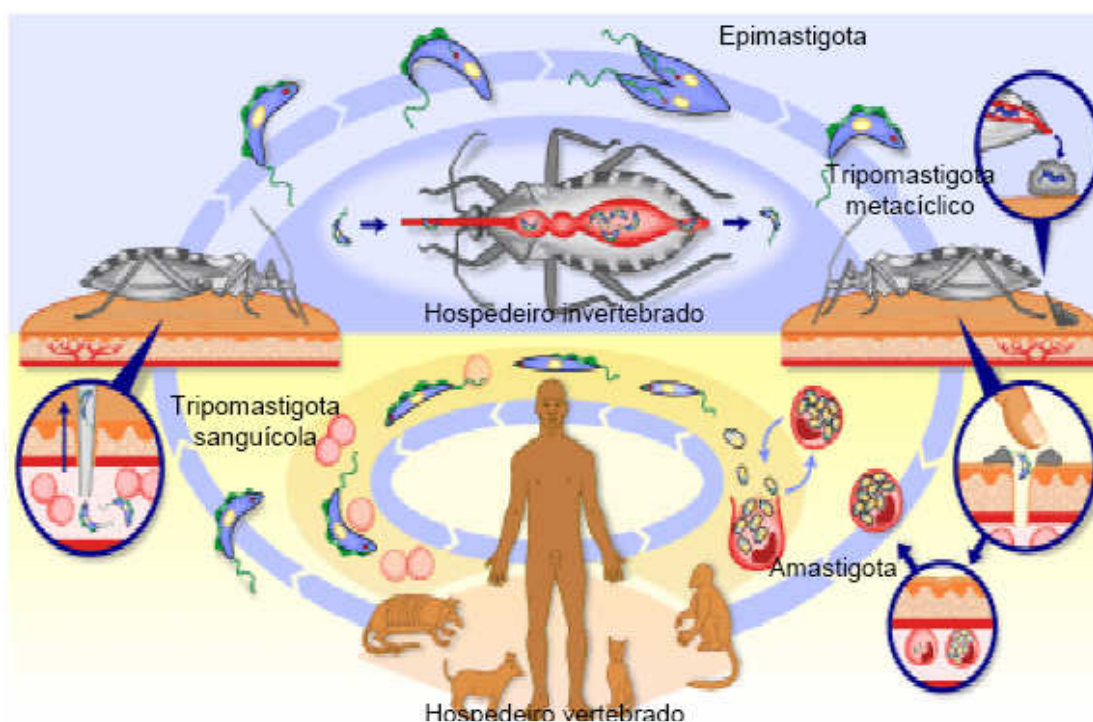
## 3 1.1 - *Trypanosoma cruzi*

4 *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado da família  
5 Trypanosomatidae, causador da doença de Chagas, zoonose que acomete 16 milhões de  
6 pessoas na América Latina (Brasil. Ministério da Saúde. 2004). Os vetores são  
7 triatomíneos que se infectam ao sugar o sangue de animais contaminados pelo parasito.  
8 Parte do ciclo vital desse protozoário ocorre no triatomíneo e a outra parte no hospedeiro  
9 vertebrado infectado. O ciclo evolutivo de *T. cruzi* envolve formas proliferativas e formas  
10 altamente diferenciadas com capacidade infectante (Chagas, 1909). Nos triatomíneos  
11 ocorrem as formas esferomastigotas, epimastigotas (proliferativas) e tripomastigotas  
12 metacíclicas. Estes últimos são eliminados junto às fezes após o repasto do inseto vetor e  
13 penetram o hospedeiro através da pele lesada ou mucosas. Chegam ao interior das células  
14 onde ocorre a diferenciação em amastigotas, que por proliferação, formam ninhos. Após a  
15 diferenciação em tripomastigotas, ocorre a ruptura da célula parasitada e a liberação dos  
16 parasitos no meio extracelular (Brenner & Andrade, 1979).

17 A primeira diferenciação do parasito no inseto vetor ocorre no estômago, onde  
18 o tripomastigota transforma-se em epimastigota poucas horas após a ingestão. A segunda  
19 diferenciação do parasito no tubo digestivo do vetor se dá quando os epimastigotas se  
20 transformam em tripomastigotas metacíclicos, sendo esta a forma infectante para o  
21 hospedeiro vertebrado (De Souza, 2000; Carlier, Torrico, 2003).

22 Os triatomíneos apresentam larga variedade de hospedeiros como gambás,  
23 cachorros, gatos, tatus, cabras, ovelhas, que servem como reservatório da doença (Dias,  
24 Laranja, Nóbrega, 1945; Pessoa, 1958; Coura, 1966), o que pode tornar difícil a completa  
25 erradicação da doença de Chagas (Dias, 2000).

1 *T. cruzi* está entre os mais bem sucedidos parasitos intracelulares. Poucos  
 2 protozoários patogênicos comparam-se a ele em termos de virulência e capacidade de  
 3 infectar vários tipos celulares (Ramirez e cols , 1998).



17 Figura 01- Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. Acesso: [www.who.int/tdrdiseaseschagas](http://www.who.int/tdrdiseaseschagas).

## 19 1.2 - Aspectos da doença de Chagas.

20 A doença de Chagas caracteriza-se por apresentar duas fases clínicas: fase  
 21 aguda e fase crônica. A fase aguda é determinada pela presença de tripomastigotas no  
 22 sangue do paciente e possui duração variável tanto na infecção humana quanto na  
 23 experimental (Prata, 1994). Pode apresentar sinal de porta de entrada aparente como o  
 24 Sinal de Romanã (edema ocular bipalpebral unilateral) ou Chagoma de Inoculação. Esta  
 25 fase da doença é caracterizada pelo aparecimento de uma miocardite, sendo detectada na  
 26 maioria das vezes através de eletrocardiograma.



1 O quadro inflamatório nos diversos órgãos apresenta relação com a presença de  
2 parasitos (ruptura dos ninhos de amastigotas), com predominância de células  
3 mononucleares próximas das células parasitadas rompidas. A inflamação tende à diminuir  
4 após a fase aguda (Andrade, 2000).

5 Passada a fase aguda aparente ou inaparente, o paciente entra então na fase  
6 crônica da doença caracterizada pela virtual escassez de parasitos no sangue ou nos  
7 tecidos, sendo detectados por técnicas imunohistoquímica ou de amplificação de DNA do  
8 parasito (Jones e col., 1993; Vago e col., 1996; Lages-Silva e col., 2001).

9 A fase crônica apresenta as seguintes formas clínicas: indeterminada, cardíaca,  
10 digestiva ou mista, sendo a indeterminada a mais freqüente. Nesta fase, que pode durar de  
11 10 a 30 anos, os pacientes apresentam exames sorológicos e de xenodiagnósticos positivos  
12 na ausência de parasitemia patente. Ocorre ausência de sinais característicos em exames  
13 radiológicos eletrocardiográficos convencionais (Prata, 1994; Andrade, 2000, Prata, 2001).  
14 Nas outras formas clínicas da fase crônica, surgem sintomas relativos a lesões irreversíveis  
15 no coração, esôfago e /ou cólon, mesmo que a quantidade de parasitos seja escassa  
16 (Andrade, 1979; 1983; Brener, Z. e Krettli, A. U. 1990).

17 Como citado anteriormente, na doença de Chagas, *T. cruzi* desenvolve nos  
18 hospedeiros vertebrados dois estágios do seu ciclo de vida que são biológica e  
19 morfológicamente distintos, com capacidade de ativar moléculas e células do sistema  
20 imune. Os tripomastigotas extracelulares são formas flageladas e não proliferativas, que  
21 circulam no sangue e são alvos potenciais de anticorpos e da lise mediada por  
22 complemento, assim como, da fagocitose e morte por fagócitos ativados. Vários grupos já  
23 mostraram a presença de anticorpos anti-*T. cruzi* em pacientes e modelos experimentais  
24 (Brener, Z.; Gazzinelli, R.T. 1997), o que demonstra a importância no controle da  
25 infecção (Aliberti, e cols, 1999; Teixeira, e col., 2006). Ao penetrar nas células do  
26 hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas (forma

1 replicativa do parasito) no citoplasma da célula hospedeira formando pseudocistos. Nesta  
2 forma intracelular o sistema imune reconhece preferencialmente a célula infectada através  
3 de epítomos do parasito apresentados no contexto do complexo de histocompatibilidade  
4 principal (CHP). Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTLs) ao reconhecerem antígenos do  
5 parasito, controlam a replicação do parasito destruindo a célula infectada. As células T  
6 CD8<sup>+</sup> e células denominadas *natural killers* (NK) participam da imunidade adaptativa e  
7 inata, respectivamente, e utilizam mecanismos similares para a destruição de seus “alvos”,  
8 embora exista o envolvimento de receptores distintos e da regulação da expressão de  
9 moléculas citolíticas, que é constitutiva nas células NK, mas regulada nas CTLs. As CTLs  
10 e as NK podem destruir seus “alvos” tanto pela liberação por exocitose de constituintes dos  
11 grânulos citolíticos, como a perforina e as granzimas, como pelo engajamento de  
12 receptores de superfície celular, tais como os membros da família dos receptores do fator  
13 de necrose tumoral (TNFR), incluindo o CD95 (ou Fas) (revisado por Lieberman, 2003).

14 Outra função crucial das células T CD8<sup>+</sup> é a produção de interferon gama (IFN-  
15  $\gamma$ ), citocina essencial para a atividade protetora destas células (revisado por Tarleton, 1991).

16 Citocinas do perfil Th1, como IFN- $\gamma$ , estão freqüentemente associadas à  
17 resistência a doenças parasitárias, como a doença de Chagas e a leishmaniose, entre outras  
18 (Brandonisio e col., 2001; Laucella e col., 2004; Dessein e col., 2004; Filisetti e col., 2004;  
19 Mary e col 1999). Estas citocinas inflamatórias podem ativar fagócitos a produzirem  
20 substâncias oxidantes, como o óxido nítrico (NO), que levam à destruição do parasito  
21 (revisado por Silva, Machado, Martins, 2003). A associação de IFN- $\gamma$  e fator de necrose  
22 tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ) induz a ativação da enzima sintase induzível de óxido nítrico (iNOS)  
23 que catalisa a reação de produção de óxido nítrico na infecção pelo *T. cruzi* (Chandrasekar  
24 e col., 1998).

25 IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  modulam a expressão de outro grupo de moléculas, as  
26 quimiocinas, também envolvidas no recrutamento celular e no controle do parasitismo de

1 macrófagos pelo *T. cruzi* (Aliberti e cols., 2001). Porém, na fase crônica da infecção  
2 chagásica, este perfil de citocinas pode estar contribuindo para a formação das lesões da  
3 fase crônica (Fresno e col., 1997; Bahia-Oliveira e col., 1998; dos Santos e col., 2001,  
4 Gomes e col., 2003).

5           Vários trabalhos têm mostrado a participação não somente das células T CD8+,  
6 mas também das células T CD4+ e das células B, no aumento da sobrevida assim como no  
7 controle do parasitismo, durante a infecção chagásica (Tarleton, R. L. 1990; Tarleton, R. L.  
8 e cols, 1992; Tarleton, R. L. e cols. 1994; Tarleton, R. L. e cols. 1996; Rottenberg e  
9 col., 1993; 1995; Kumar e Tarleton, 1998) . As células T CD4+ direcionam e potencializam  
10 mecanismos efetores, incluindo a mudança de isotipos de anticorpo, e ativação de fagócitos  
11 e células T CD8+. Estas últimas são capazes de reconhecer as células infectadas e destruí-  
12 las, passando a ser um importante mecanismo efetor no controle do parasitismo. Alguns  
13 trabalhos propõem que na fase crônica da doença de Chagas, as células CD4+ respondam  
14 de forma deletéria contra antígenos próprios, desencadeando reações inflamatórias de  
15 cunho auto-imune, sendo estas responsáveis pela manutenção da intensa miocardite  
16 crônica (Ribeiro dos Santos e cols., 1991; Dos Santos e cols., 1992; 2001). No entanto, em  
17 pacientes cardiopatas crônicos, a miocardite é formada principalmente pelas células T  
18 CD8+ (Reis e col., 1993a; Higuchi e col., 1993; 1997; D D Reis., 1993).

### 19           **1.3 – O processo de adesão e invasão de *T.cruzi* na célula hospedeira**

20           A interação *T. cruzi*-célula hospedeira inicia-se com a adesão do parasito à  
21 superfície celular da mesma, entretanto, nem todos os parasitos que estão aderidos a essa  
22 superfície permanecem fixos a ela. O grau de adesão varia de acordo com a cepa do  
23 parasito, com a forma evolutiva (nem todas as formas evolutivas aderem na célula  
24 hospedeira) e com o tipo celular hospedeiro (de Carvalho, T. U. 2008).

25           O processo de adesão e invasão da célula hospedeira pelo parasito envolve a  
26 participação de diversas moléculas de superfície do parasito ancoradas em moléculas GPI

1 (glicosilfosfatidilinositol) de membrana (Previato e col, 1985; Yoshida e col, 1989;  
2 Schenkman e col, 1993; revisão em Acosta Serrano e col, 2001).

3 Formas tripomastigotas de *T. cruzi*, não sintetizam ácido siálico, (Schauer e  
4 col., 1983), mas possuem glicoproteínas de ação enzimática localizadas na superfície da  
5 membrana denominadas transialidades responsáveis pela captação deste ácido siálico na  
6 célula hospedeira através de moléculas do tipo mucinas ligadas por âncora de GPI na  
7 superfície do parasito (Previato e col, 1985; Yoshida e col, 1989; Schenkman e col, 1993;  
8 revisão em Acosta Serrano e col, 2001). Este fenômeno é importante para o processo de  
9 interação com a célula hospedeira e interiorização do parasito (Rodriguez e col.,1999).

10 Existe uma família de moléculas presentes na superfície do parasito  
11 denominada Tc85 que participa do processo de invasão celular. Esta molécula pertence a  
12 uma família multigênica, com pelo menos alguns componentes envolvidos no processo de  
13 adesão do parasito na célula hospedeira com a laminina (Abuin e col., 1989; Giordano e  
14 col., 1994). As moléculas Tc85 presentes na superfície do *T. cruzi*, ao se ligarem a  
15 receptores específicos na membrana das células hospedeiras, promovem alterações do  
16 citoesqueleto e facilitam a entrada do parasito (Magdesian e col., 2001).

17 Diversos tipos de carboidratos podem estar envolvidos no processo de adesão e  
18 invasão da célula hospedeira pelo *T. cruzi* (revisão em Zingales & Colli, 1985), sendo que  
19 além de lipopeptidofosfoglicana (LPPG), foram descritos sialoglicolipídios, lipídios  
20 sulfatados em epimastigotas (Petry e col, 1987) e glicoinositolfosfolipídios (GIPLs) em  
21 formas tripomastigotas (Heise e col., 1996, Ropert e col., 2002).

22 A LPPG é um glicosilinositolfosfolipíde extremamente abundante na superfície  
23 de epimastigotas (Alves & Colli, 1975), sendo o primeiro a ser isolado em  
24 tripanosomatídios (Lederkremer, e col., 1976; 1980). A LPPG também é encontrada em  
25 tripomastigotas metacíclicos, embora em menor quantidade e somente em 15% da  
26 população de parasitos (Golgher e col., 1993). É considerada uma

1 glicoinositolfosfoceramida (Lederkremer e col., 1978) e acredita-se que o componente  
2 ceramida esteja envolvido na capacidade de bloquear a ativação de células T (Gomes e  
3 col., 1995; Lopes & Dos Reis, 1996).

4 A cruzipaína está relacionada com a invasão de células pelo *T. cruzi*  
5 (Scharfstein e col., 2000). Em epimastigotas, a cruzipaína parece estar ligada a processos  
6 de degradação, com localização no sistema endossomal-lisossomal (Murta e col., 1990),  
7 mas em tripomastigotas foi descrita como tendo papel na adesão (Souto-Padrón e  
8 col., 1990) e invasão celular (Meirelles e col., 1992).

9 Existe uma molécula sensível a tripsina denominada Tc-tox que está envolvida  
10 no mecanismo de escape do parasito do vacúolo parasitóforo (revisão em Andrews, 2002).

11 As gp82 são moléculas encontradas em tripomastigotas metacíclicos e  
12 relacionadas com invasão desta forma evolutiva (Ramirez e col., 1993). A gp82 liga-se à  
13 célula hospedeira, induzindo um aumento da concentração de cálcio intracelular (Dorta e  
14 col., 1995; Yoshida e col., 2000).

15 A gp90 é uma proteína N-glicosilada, (Yoshida e col., 1990) com âncora de  
16 GPI, (Shenkman e col., 1988; Guther e col., 1992) também relacionada com a invasão da  
17 célula hospedeira por formas tripomastigotas metacíclicas (Yoshida e col., 1990).

18 Além destas moléculas de superfície podemos citar várias outras que podem  
19 estar participando do processo de invasão (Shenkman e col., 1991; Araújo Jorge e col.,  
20 1992) como algumas moléculas da superfamília das transialidases (Moody e col., 2000;  
21 Turner e col., 2002). Entre as glicoproteínas podemos citar gp83 (Villalta e col., 2001) e gp  
22 35/50 (RUIZ e col., 1998) que estão ancoradas à âncoras de GPI.

23 As glicoproteínas de superfície de *T. cruzi* são importantes para mobilização de  
24 cálcio intracelular, tanto no parasito quanto na célula hospedeira, sendo este fenômeno de  
25 grande importância para o processo de interiorização de *T. cruzi*. A capacidade do parasito  
26 de invadir células hospedeiras e mobilizar cálcio intracelular varia entre as populações de

1 *T. cruzi*. A diversidade de glicoproteínas na membrana do parasito pode estar relacionada  
2 com a habilidade de invasão de células (Ruiz, e col., 1998; Neira e col., 2002 ).

3

#### 4 **1.4 - Fatores do hospedeiro envolvidos no controle da infecção e na** 5 **patogênese da doença de Chagas**

6 O óxido nítrico (NO) é o produto de diferentes tipos celulares em mamíferos,  
7 com funções importantes na homeostase e na defesa do hospedeiro. Possui ação citostática  
8 e vasodilatadora durante o processo de reparos e cicatrização regulando a proliferação e  
9 diferenciação de diversos tipos celulares (revisão em Schwentker e col., 2002). O NO é  
10 resultante da ação da enzima NO sintase (NOS) sobre a L-arginina.

11 O óxido nítrico tem potente ação tripanocida isoladamente ou em associação  
12 com a água oxigenada (Oliveira e col., 1997). Os agentes fisiológicos que regulam a  
13 síntese de NO podem ser divididos em três classes: 1) Agonistas que atuam rapidamente,  
14 ativando a síntese de NO em poucos minutos, principalmente através da NOS<sub>c</sub>; 2)  
15 Indutores que atuam gradualmente ativam a síntese de NO após algumas horas e 3)  
16 Agentes que suprimem a síntese de NO ( Moncada, 1992; Nathan 1992). Este grupo de  
17 indutores que atuam de forma gradual é principalmente constituído por citocinas.

18 A NOS é expressa em três formas funcionais: a constitutiva, representada pela  
19 Óxido Nítrico Sintase endotelial (eNOS), Óxido Nítrico Sintase neuronal (nNOS) e a  
20 Óxido Nítrico Sintase induzida (iNOS). As duas primeiras são dependentes de Ca<sup>2+</sup> e agem  
21 por curtos períodos de tempo em diferentes tipos celulares, como o endotélio e neurônio. A  
22 iNOS produz NO por longos períodos, tem atividade independente de Ca<sup>2+</sup> e é expressa em  
23 resposta a estímulos apropriados sobre macrófagos, neutrófilos, células musculares lisas  
24 vasculares, cardiomiócitos e células de Schwann (Nathan, 1992).

25 Utilizando-se bloqueadores específicos para a enzima iNOS, observa-se a  
26 inibição da atividade tripanocida dos macrófagos de camundongos *in vitro* e *in vivo*.

1 Gazzinelli e col., (1992).; Vespa e col., (1994). Munhoz-Fernandez e col., (1992) sugeriram  
2 que algumas citocinas como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )  
3 estariam envolvidos com a atividade tripanocida de macrófagos de camundongos BALB/c  
4 através de uma mecanismo NO-dependente.

5 As citocinas apresentam grande importância no curso da infecção da doença de  
6 Chagas (Silva e col., 1992). No ser humano, a resposta imune *anti-T. cruzi* demonstra que o  
7 padrão da infecção pelo *T. cruzi* é determinada pela larga extensão de citocinas produzidas  
8 em resposta ao parasito (Silva e col., 1995; Silva e col., 1998; Aliberti e col., 1996; Martins  
9 e col., 1999). *T. cruzi* replica-se intracelularmente e pode infectar diferentes tipos de  
10 células sanguíneas, incluindo macrófagos. O aumento dos níveis de citocinas inibe a  
11 replicação do parasito em macrófagos e parece influenciar no resultado da infecção. IFN- $\gamma$   
12 é a principal citocina da resposta Th1, com notável capacidade de ativar macrófagos e  
13 inibir replicação intracelular do parasito e a sua produção se dá logo após a adesão e  
14 invasão do parasito na célula hospedeira (Cardillo, 1996; Aliberti e col., 2001).

15 Outras citocinas como IL-4 (padrão Th2), TGF- $\beta$  e IL-10 possuem ação anti-  
16 inflamatória e são capazes de inibir a ativação dos macrófagos induzidos por IFN- $\gamma$ ,  
17 inibindo tanto a liberação dos metabólicos tóxicos quanto a diferenciação de células Th1,  
18 caracterizando um parasitismo sustentado (Reed e col., 1994; Abrahamsohn, 1998;  
19 Brodskyn & Barral-Neto, 2000).

20 Uma série de evidências tem demonstrado que a imunidade inata age como um  
21 componente-chave da resistência do hospedeiro contra protozoários, controlando seu  
22 crescimento durante a fase aguda (tripomastigota) da infecção. As células (NK)  
23 desempenham um papel importante nessa fase, influenciando no desenvolvimento da  
24 imunidade celular adquirida (Scott & Trinchieri, 1995). Muitos protozoários induzem a  
25 ativação de células NK em hospedeiros infectados, o que tem sido demonstrado pelo  
26 aumento da atividade lítica das células do hospedeiro contra alvos sensíveis à ação de

1 células NK (células K 562 ou NC-37, por exemplo), pelo aumento do número de  
2 populações linfocitárias exibindo marcadores característicos das células NK (CD 16, CD  
3 56, CD 69 no homem). No camundongo, esse aspecto foi também observado pela indução  
4 da síntese de IFN- $\gamma$  em animais deficientes em células T (Scharton-Kersten, 1995;  
5 Stevenson e col., 1997).

6 O processo inflamatório tem início após a infecção, caracterizado pela presença  
7 multifocal de infiltrado inflamatório no tecido e recrutamento de células mononucleares,  
8 que normalmente ficam aderidas aos cardiomiócitos e induzindo a miocitolise, e  
9 freqüentemente levando a fibrose intersticial. Embora o parasitismo de tecido seja raro na  
10 fase crônica da infecção, pode haver a produção de antígenos em decorrência da presença  
11 do parasito, resultando em uma resposta imune (Cabral, H.R., e cols.2002,).

12 Em cada fase da doença de Chagas, existe uma resposta imune específica com  
13 repertório de células, citocinas e outras substâncias, que reduzem a carga parasitária,  
14 auxiliando na defesa do organismo, mas que podem estar envolvidos no desenvolvimento  
15 da patologia. Em consequência disto, têm sido realizados muitos trabalhos, principalmente  
16 experimentais, buscando a compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta do  
17 hospedeiro frente à infecção (Janeway, 2001).

18 No início da infecção experimental são observados eventos de caráter clínico  
19 desencadeados pela imunidade inata do hospedeiro, como hepatoesplenomegalia,  
20 linfadenopatia regional, atrofia dos linfonodos mesentéricos e do timo (Ferreira, e col.,  
21 2002). Essas alterações são acompanhadas pela ativação policlonal de linfócitos T e B,  
22 hipergamaglobulinemia, seguido por uma imunossupressão da resposta linfocitária e  
23 aumento de processos de apoptose (revisão em Brener & Gazzinelli, 1997; Dos Reis,  
24 1997). O principal papel desenvolvido pela resposta imune no início da infecção é reduzir  
25 e controlar a replicação do parasito através de uma resposta imune efetiva (Lopes e Dos  
26 Reis, 1994).



1 Os mecanismos imunológicos relevantes tanto para a resistência como para a  
2 patogênese da doença de Chagas são inúmeros e não estão completamente esclarecidos,  
3 envolvendo muitos tipos celulares e mediadores da imunidade inata e adaptativa. De fato, a  
4 infecção pelo *T. cruzi* ocasiona diversas alterações na homeostasia do sistema imune do  
5 hospedeiro, e a infecção experimental murina pelo *T. cruzi* tem sido a maior fonte de  
6 conhecimento sobre a sua imunobiologia. As alterações clássicas da infecção experimental  
7 incluem a ativação policlonal de linfócitos B e T em órgãos linfóides secundários, a  
8 hipergamaglobulinemia, e a imunossupressão a antígenos homólogos e heterólogos  
9 (Minoprio e col., 1986; Minoprio e col., 1989).

10 Quimiocinas são uma superfamília de pequenos polipeptídeos, sendo que a  
11 maioria apresenta cerca de 90 a 130 resíduos de aminoácidos. São as principais moléculas  
12 reguladoras do tráfego leucocitário. São responsáveis pela orientação, pelo processo de  
13 quimiotaxia, pela migração dos leucócitos, ativação de respostas inflamatórias e  
14 participação em outras funções, incluindo a regulação do crescimento dos tumores através  
15 de quatro mecanismos moleculares: 1) antígenos associados aos tumores, 2) resposta  
16 imunológica específica às células tumorais, 3) estimulação da proliferação das células  
17 tumorais e 4) moléculas relacionadas à metástase (Aliberti e col., 2001). Podem ser  
18 agrupadas dentro de quatro principais subfamílias, caracterizadas pela posição de dois  
19 resíduos conservados (domínios) de cisteínas: CXC, CC, C e CXXXC. Os receptores de  
20 quimiocinas pertencem a uma superfamília de rodopsina ligada à proteína G. Cada receptor  
21 tem a capacidade de se ligar a mais de uma quimiocina dentro de uma subfamília. Até o  
22 presente momento 18 receptores tem sido descrito (cinco receptores CXC, 11 CC, 1 C e 1  
23 CXXXC).

24 Estes receptores possuem algumas características em comum, como: domínios  
25 transmembrana, dobras intra e extracelulares, extremidade citoplasmática C-terminal

1 contendo um sítio de fosforilação de serina e treonina, e uma extremidade N-terminal  
2 extracelular (Machado e col., 2000).

3 Certas quimiocinas como RANTES (*Regulated upon Activation Normal T cell*  
4 *Expressed and Secreted*), MCP-1 (Proteína quimiotática de macrófagos-1) e MIP-1 $\alpha$   
5 (Proteína inflamatória de macrófagos-1 alfa) podem ser importantes moduladores da  
6 resposta inflamatória e do controle da doença de Chagas. Muitas aparentam engatilhar a  
7 síntese de citocinas pró-inflamatórias, induzindo a produção de NO por macrófagos  
8 durante a infecção por *T. cruzi in vitro* (Aliberti e col., 1999; 2001). Devido a seu papel de  
9 atração de células para o sítio da lesão, são consideradas muito importantes no processo de  
10 defesa do hospedeiro (Deng e col., 2003).

11 Imunidade Inata pode ser rápida e não específica, não exige exposição prévia ao  
12 patógeno, não é modificada por exposições repetidas ao patógeno. Apesar de cada sistema  
13 possuir fatores solúveis e elementos celulares próprios, existe a necessidade de atuação em  
14 conjunto para a máxima eficácia na defesa.

15 Uma das moléculas envolvidas no reconhecimento são chamados de Receptores  
16 do tipo Toll (TLR). Eles são responsáveis pelo reconhecimento de moléculas específicas  
17 de patógenos (PAMPs), o que representa um importante mecanismo de resistência na  
18 infecção e na modulação da resposta imune inata para adaptativa (Petersen, C.A 2005).

19 A resposta imunológica adquirida envolve anticorpos e receptores de linfócitos  
20 T originados de expansão clonal contribuindo para o desenvolvimento da resposta eficiente  
21 contra os agentes infecciosos. Já os receptores do tipo Toll são expressos constitutivamente  
22 pelas células do hospedeiro e estão relacionados com uma resposta imediata a agentes  
23 infecciosos, combatendo a infecção até que resposta adquirida se desenvolva. (Underhill,  
24 D.M 1999).

25 Seus mecanismos são rápidos, fixos em seu modo de ação e efetivos em  
26 interromper a maioria das infecções em um estágio precoce, no entanto, nem sempre têm a

1 capacidade de eliminar a infecção. Suas características são aquelas que ele apresenta por  
2 toda vida, não tendo especificidade nem memória. As células e as moléculas da imunidade  
3 inata identificam classes comuns de patógenos e as destroem com mecanismos que  
4 resistiram ao teste do período evolutivo e são continuamente úteis (Parham, 2001).

5 Os componentes da imunidade inata são barreiras mecânicas, produtos  
6 secretados, além de incluir fagócitos mononucleares e células Natural Killer (NK). Nesse  
7 também são incluídas proteínas como os componentes do complemento, os quais são dito  
8 ser moléculas solúveis porque estão dissolvidas nos fluidos corporais, ao invés de estarem  
9 associadas ou estocadas em células (Wood; Austyn, 1993).

10 A resposta imune inata não só exerce uma função protetora importante, como  
11 também serve para iniciar e regular a subsequente resposta imune adquirida (Abbas;  
12 Lichtman; Pober, 2002).

13 O sistema imune inato é uma forma antiga e geral de discriminação de perfis  
14 moleculares. O reconhecimento imune inato depende de um número ilimitado de  
15 receptores. Esses receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) estão envolvidos no  
16 reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) (Janeway,  
17 2002) alguns autores identificaram os perfis de ligantes endógenos para estes receptores.  
18 Essa foi uma das maiores descobertas e levou à afirmação que tais ligantes seriam os  
19 padrões complementares originais (Seong e Matzinger, 2004) enquanto que os PAMPs de  
20 patógenos apenas tem o sinergismo de uma atividade referenciada no organismo.

21 Existem os componentes clássicos da imunidade inata, como células dendríticas  
22 (DC), macrófagos e células NK que parecem ter um papel crucial na imunidade parasitária  
23 e principalmente a anti-*T. cruzi*. Além disso, existem diferentes moléculas de superfície do  
24 parasito têm sido identificadas como indutoras da imunidade inata, dentre elas destacam-se  
25 as âncoras de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), as GPI ligadas covalentemente às

1 glicoproteínas semelhantes a mucinas, as GPI-mucinas, e a enzima trans-sialidase (TS)  
2 (Gazzinelli e Denkers, 2006).

3 A ativação de receptores TLR utiliza uma via de transdução de sinal que  
4 consiste no recrutamento de várias proteínas intracelulares (MyD88, IRAK e TRAF-6)  
5 que vão desencadear as vias JNK e ERK da cascata MAPK, envolvidas na ativação dos  
6 factores de transcrição AP-1 e NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B), favorecendo a expressão de  
7 genes envolvidos na resposta inflamatória (Abbas & Lichtman, 2002).

8 O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição que é ativado em resposta a sinais de TCR e  
9 que é essencial na síntese de citocinas (Abbas e Lichtman, 2002). As proteínas NF- $\kappa$ B são  
10 importantes na transcrição de muitos genes em vários tipos de células, particularmente nas  
11 células do sistema imunitário (Abbas e Lichtman, 2002).

12 A ativação das APCs via os TLRs 2, 4, 6 e 9 levam à indução de genes de  
13 citocinas pró-inflamatórias como TNF, IFN- $\gamma$ , IL-12, controlando a replicação do parasito  
14 (Campos e Gazzinelli, 2004)

15 Cada TLR liga-se uma variedade de PAMPs que funcionam como marcadores  
16 moleculares de agentes patogênicos. Até agora, 11 membros da família TLR (TLR1-  
17 TLR11) foram identificados em mamíferos. TLR1, TLR2, TLR6, TLR4 e TLR5  
18 (localizados na membrana plasmática) e TLR3, TLR7, TLR9 (localizados na superfície  
19 celular). O TLR2 está envolvido na resposta a uma grande variedade de bactérias que  
20 incluem os componentes destes microrganismos a camada de peptidoglicanos. Outro tipo  
21 de receptor o TLR3 reconhece dsRNA, que é um produto viral e o TLR9 que reconhece  
22 material encontrado no genoma de bactérias e vírus, mas não de vertebrados. O TLR7  
23 reconhece compostos farmacêuticos de nome Imiquimod (também conhecido como  
24 Aldara, R-837 ou S-26308) e Resiquimod (também conhecido como R-848 ou S-28463)  
25 (Kanae & Hiroaki, 2006).

1           A resposta imune é geralmente classificada em três grupos. Os membros do  
2 TH-1 inclui as interleucinas que são produzidas pelos macrófagos, monócitos e células  
3 dendríticas e todos estas presentes na Imunoglobulina (Ig). Os membros do TH-2 estão  
4 associados as moléculas dos patógenos (LPS, peptidoglicanos, etc). Um terceiro TH-3 é  
5 constituído por proteínas que são exclusivamente citosólicas. Os receptores (TLR)  
6 sinalizam o sistema imunológico contra microorganismos invasivos tanto para a imunidade  
7 inata e adaptativa em invertebrados e vertebrados (Taro e Shizuo, 2005). Trabalhos  
8 recentes demonstraram que a participação do receptor TLR-4 na resistência à infecção pelo  
9 *T. cruzi* (Oliveira e col., 2004). Os mecanismos responsáveis pela maior resistência dos  
10 animais que expressam a molécula TLR- 4 em resposta a cepa Y de *T. cruzi* depende da  
11 produção *in vivo e in vitro* das citocinas sabidamente envolvidas na resposta imune ao  
12 parasito (Lonsdale-Eccles e col., 1995).

13           É importante destacar o papel do fator diferenciação mieloide (MyD88), que é  
14 uma proteína essencial para a função de TLRs, é importante no controle da parasitemia e  
15 da infecção em relação ao *T. cruzi* (Campos & Gazzinelli., 2004).

16           Componentes clássicos da imunidade inata, como células dendríticas (DC),  
17 macrófagos e células NK parecem ter papel crucial na imunidade anti-*T. cruzi*. Além disso,  
18 diferentes moléculas de superfície do parasito têm sido identificadas como indutoras da  
19 imunidade inata, dentre elas destacam-se as âncoras de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), as  
20 GPI ligadas covalentemente às glicoproteínas semelhantes a mucinas, as GPI-mucinas, e a  
21 enzima trans-sialidase (TS) como já citado no texto anteriormente (revisado por Gazzinelli  
22 e Denkers, 2006).

23           Diversos estudos vêm demonstrando o envolvimento dos TLRs na infecção  
24 pelo *T. cruzi*. De fato, na infecção experimental pelo *T. cruzi*, Campos e colaboradores  
25 (2001) observaram que os macrófagos de camundongos deficientes de TLR2 (TLR2<sup>-/-</sup>)  
26 não produziam citocinas pró-inflamatórias após estimulação com GPI. *T. cruzi* possui a

1 capacidade de evadir dos mecanismos de defesa da célula hospedeira. Isto pode ser  
2 determinado por alterações imunológicas básicas como apresentação de antígenos e  
3 funções imuno-reguladoras bem como modificações das vias de sinalização celular,  
4 facilitando a evasão da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro (Sacks & Sher,  
5 2002). O parasito consegue escapar da ação microbicida do macrófago através do  
6 fagolisossomo, modulando o perfil de citocinas secretadas ao nível da transcrição. Existe  
7 uma mucina ancorada em GPI na superfície do parasito denominada AgC10 capaz de se  
8 ligar e induzir a secreção de IL-1 $\beta$  e não IL-12 ou TNF- $\alpha$  que seriam as condições normais  
9 para a defesa contra o parasito (De Diego e col., 1997; Zambrano-Villa e col., 2002). A  
10 gp160, glicoproteína de superfície de tripomastigotas de *T. cruzi*, inicialmente identificada  
11 por Martins e colaboradores (1985) e posteriormente purificada por Norris e col., (1989),  
12 mostrou-se muito importante na regulação do sistema complemento do hospedeiro. Esta  
13 glicoproteína liga-se a C3b e C4b, bloqueando a formação da cascata por inibição da C3  
14 convertase, enzima central da cascata do complemento (Norris e col., 1991; 1994).

15           É possível que mecanismos imunológicos envolvidos na interação conjunta de  
16 células do sistema imune, além da susceptibilidade genética diferencial do hospedeiro, gere  
17 uma patologia altamente complexa, impondo dificuldades para o desenvolvimento de  
18 vacinas e imunoterapias eficientes. O desenvolvimento de estratégias terapêuticas visando  
19 a regulação da funcionalidade celular e da modulação de componentes inflamatórios,  
20 associado às drogas anti-parasitárias, seriam alvos importantes no tratamento da doença de  
21 Chagas. Sendo assim, conhecer os fenômenos decorrentes da interação de formas  
22 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* com células da resposta imune inata tem grande  
23 importância para o entendimento dos primeiros eventos da relação parasita hospedeiro.

24 No parasito *T. cruzi*, já identificaram, que os receptores do tipo Toll 2 reconhecem a ancora  
25 (glicosilfosfatidilinositol) GPI dos protozoários, ou seja, os glicolípídeos dominantes na  
26 superfície dos protozoários. Além disto, estão sendo estudados animais geneticamente

1 modificados e deficientes em diferentes receptores do tipo Toll ou alternativamente  
2 moléculas adaptadoras responsáveis pela sinalização desses receptores. Esses estudos, no  
3 modelo experimental, são necessários para comprovar se eles estariam envolvidos  
4 diretamente, no controle da infecção deste parasita ou no desenvolvimento da Doença de  
5 Chagas, já que é de conhecimento que algumas moléculas do sistema imune com atividade  
6 pró-inflamatória são críticas para essa patologia (Hiroaki e col., 2000).

## 1 **2- OBJETIVOS**

---

2

### 3 **2.1- Objetivo Geral:**

4 - Analisar a interação do *Trypanosoma cruzi* com células da resposta imune inata;

5

### 6 **2.2 - Objetivos Específicos:**

7

8 -Avaliar os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10, RANTES/ CCL5, MIG / CXCL9, MCP-  
9 1/CCL2 e MIP-1 $\alpha$ /CCL3 no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue  
10 periférico de indivíduos soronegativos para doença de Chagas em resposta à exposição a  
11 formas tripomastigotas vivas de *Trypanosoma cruzi*;

12

13 - Avaliar os níveis de nitrito no sobrenadante de cultura de células mononucleares do  
14 sangue periférico de indivíduos soronegativos para doença de Chagas em resposta à  
15 exposição a formas tripomastigotas vivas de *Trypanosoma cruzi*.



### 1 **3- JUSTIFICATIVA**

---

2

3 Fatores celulares e moleculares do hospedeiro estão envolvidos na resistência à  
4 infecção por *T. cruzi*, bem como em processos patogênicos, destacando-se a produção de  
5 quimiocinas, citocinas e de óxido nítrico (Nathan, 1992; Tarleton e col., 1992; Munhoz-  
6 Fernandez e col., 1992; Gazzinelli e col., 1992; Petray e col., 1994; Vespa e col., 1994;  
7 Silva e col., 1995; Cardillo e col., 1996; Villalta e col., 1998; Aliberti e col., 1999; Silva,  
8 1999; Scianni, 2001).

9 Os mecanismos imunológicos relevantes tanto para a resistência como para a  
10 patogênese da doença de Chagas são inúmeros e não estão completamente esclarecidos,  
11 especialmente aqueles envolvendo células da resposta imune inata (GOMES, J.A.S. e cols.  
12 2003)

13 Sabendo-se da grande importância da relação *T. cruzi*-célula hospedeira, este  
14 trabalho visa realizar uma análise da interação da forma tripomastigotas da cepa Y de *T.*  
15 *cruzi* com células do sistema imune inato, avaliando a resposta de células mononucleares  
16 do sangue periférico e de células do sangue total frente a formas vivas de tripomastigotas ,  
17 considerando a síntese de citocinas e quimiocinas (IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10, MIG, MIP-1 $\alpha$ ,  
18 MCP-1 E RANTES) bem como a produção de óxido nítrico.

## 1 **4.0 MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 3 **4.1 - Obtenção dos parasitos**

4 Formas tripomastigotas da cepa Y foram obtidas através de punção cardíaco em  
5 camundongos infectados cedidos pelo Laboratório de parasitologia da UFTM. O sangue foi  
6 coletado em tubo estéril de 15 mL junto à meio RPMI(GIBCO) suplementado. Fez-se a  
7 centrifugação a 115 g por 5 minutos à temperatura ambiente. Coletou-se o sobrenadante e  
8 centrifugou a 800 g por 20 minutos a 5 °C. Posteriormente estes parasitos foram colocados  
9 em cultura de células VERO CCL8s, que foram gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup> Neide  
10 Maria da Silva da Disciplina de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU),  
11 utilizados na infecção dos PBMCs.

### 12 **4.2 - Obtenção e cultivo de células para coleta de sobrenadante**

13 Foram utilizadas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e de sangue  
14 total de 16 indivíduos com idade entre 20 e 45 anos saudáveis com sorologia negativa para  
15 doença de Chagas. Estes indivíduos foram convidados a participar deste estudo e  
16 assinaram o termo de consentimento.

17 O protocolo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) / UFTM com  
18 o N° 0905 no ano de 2007.

19 As populações celulares foram obtidas da seguinte forma:

20 Foram coletados 10 mL de sangue venoso em presença de heparina (5U de heparina por  
21 mL de sangue) colocados em tubos plásticos cônicos de 50 mL na presença de Ficoll-  
22 Hipaque (PHARMACIA) com densidade de 1,073. Os tubos foram centrifugados a 400 g  
23 por 20 minutos a 18°C. Após a centrifugação, a capa leucocitária de células  
24 mononucleares, na interface, entre a solução de Ficoll e o plasma, foi coletado com o  
25 auxílio de uma pipeta graduada e transferido para outro tubo cônico de 50 mL. O excesso

1 de Ficoll foi removido por centrifugação, lavando-se as células por três vezes, com 30ml  
2 de meio RPMI (GIBCO) incompleto em cada lavagem, a 200 g a 4°C por 15 minutos. As  
3 células foram ressuspensas em meio RPMI (GIBCO) suplementado com 5% de soro fetal  
4 bovino inativado, com 80 mg/dL de gentamicina e 2β mercaptanol, para os ensaios de  
5 produção de sobrenadantes a uma concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. A quantidade de  
6 células obtidas foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade  
7 celular foi determinada utilizando-se o teste de exclusão em solução de Turk. Todos os  
8 procedimentos foram realizados em condições estéreis, utilizando-se capela de fluxo  
9 laminar, com exceção da contagem de células, que é realizada por amostragem.

10           Para a obtenção de leucócitos totais, foram coletados também 10 mL de sangue  
11 venoso em presença de heparina (5U de heparina por mL de sangue) colocados em tubo  
12 plásticos cônicos secos a quantidade de 1,5 mL de sangue total na presença de 6,0 mL de  
13 meio RPMI (GIBCO), os tubos foram centrifugados a 400 g por 20 minutos a 18°C. Após a  
14 centrifugação, a capa leucocitária do sangue total foi retirada e procedeu-se da mesma  
15 maneira já citada anteriormente, as células também foram ressuspensas em meio RPMI  
16 (GIBCO) suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado, com 40 mg/dL de  
17 gentamicina e 2β mercaptanol, para obtenção de sobrenadantes a uma concentração de  $2 \times$   
18  $10^6$  células/mL. A quantidade de células obtidas foi determinada também por contagem em  
19 câmara de Neubauer e a viabilidade celular também foi determinada utilizando-se o teste  
20 de exclusão em solução de Turk.

21           As células mononucleares e de sangue total obtidas como descrito acima foram  
22 ressuspensas a concentração de  $2,5 \times 10^6$  parasitos/poço em meio RPMI incompleto e  
23 incubadas por 24 horas em estufa incubadora com atmosfera enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub>.  
24 Um ml da suspensão celular foi distribuído em cada orifício de placa de 24 poços. As  
25 células foram incubadas em presença de formas tripomastigotas vivas de cepa Y do

1 *Trypanossoma cruzi*, por 24 horas em estufa incubadora a 37°C com atmosfera enriquecida  
2 com 5% de CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados em freezer -70°C, até a  
3 análise.

#### 4 **4.3 - Ensaio Imunoenzimático**

5 As concentrações das citocinas TNF- $\alpha$  / IL-12 / IL10, assim como as  
6 quimiocinas MIG / MCP-1 / MIP-1  $\alpha$  / RANTES foram mensuradas por ELISA do tipo  
7 *sandwich*. Placas de 96 poços de fundo chato de alta sensibilidade (*NUNC – Maxisorp*,  
8 *Rochester, NY, USA*) foram sensibilizadas com 50  $\mu$ l de anticorpo primário monoclonal  
9 anti TNF-  $\alpha$ , anti IL-12, anti IL-10 e das as quimiocinas MIG / MCP-1 / MIP-1  $\alpha$  /  
10 RANTES em tampão carbonato bicarbonato pH 9,4 por 18 horas a 4°C. Posteriormente,  
11 foram lavadas com PBS/Tween a 0,05 % em lavadora automática, bloqueadas com 200 $\mu$ l  
12 de PBS/BSA 2% (4 horas/temperatura ambiente) e lavados novamente com PBS/Tween  
13 0,05%.

14 As amostras de sobrenadantes de cultura, diluídas 1:1 em PBS/BSA 2% foram  
15 adicionadas à placas e, paralelamente, realizada a curva padrão com diluição seriada das  
16 respectivas citocinas e quimiocinas recombinantes. As amostras juntamente com a curva  
17 foram incubadas por 18 horas a 4°C. Os poços foram então lavados com PBS/Tween e  
18 distribuídos uma quantidade de 70  $\mu$ l/poço com o respectivo anticorpo monoclonal  
19 secundário conjugado à biotina, permanecendo por duas horas a temperatura ambiente e  
20 lavando-se subseqüentemente com solução de PBS/Tween. Após esta etapa, foram  
21 pipetados 100 $\mu$ l, poço de fosfatase alcalina conjugada à estreptavidina em PBS/BSA 2%,  
22 permanecendo por duas horas a temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram  
23 lavadas com PBS/Tween adicionando-se, em seguida, 100 $\mu$ l/poço do substrato indutor de  
24 atividade enzimática p-nitrophenyl fosfato. A absorbância foi mensurada em leitor de  
25 microplacas com filtro de 405 nm (*Biorad 2550 Reader EIA., USA*).

#### 1 **4.4 - Dosagem de Óxido Nítrico**

2           Para dosagem de nitrito utilizou-se reação de Griess (Green et al., 1981),  
3 preparada misturando-se na proporção de 1:1 da solução de sulfanilamida (Sigma) a 1%  
4 com solução de naftilenodiamida (Sigma) a 0,1% ambas em ácido fosfórico 2,5% (Merck,  
5 Brasil). Para dosagem usaram-se 50 µl de sobrenadante de cada poço. A absorbância em  
6 550 nm foi lida (BIORAD) e a concentração de nitrito determinada em referência à curva  
7 padrão de 0,078 a 10·µM de NaNO<sub>2</sub>.

#### 8 **4.5 - Análise estatística**

9           As variáveis contínuas foram submetidas a testes de normalidade. Foram  
10 aplicados os testes de Mann Whitney ou Kruskal Walis para duas ou três variáveis de  
11 grupo respectivamente. Foi considerado significativo o valor de  $p < 0,05$  e os valores  
12 encontrados da mediana.

## 1 5. RESULTADOS

---

2

3 O sangue de 16 indivíduos com sorologia negativa para doença de Chagas foi colhido  
4 para fracionamento celular e posterior cultivo. Foram avaliados os níveis de IL-12, IL-10, TNF- $\alpha$ ,  
5 MCP-1, MPI-1 $\alpha$ , RANTES e MIG, bem como os níveis de nitrito produzidos por células  
6 mononucleares do sangue periférico e de sangue total após a interação ou não com formas  
7 tripomastigotas vivas de *T. cruzi*.

8 No sobrenadante de culturas de PBMC sem estímulo com o parasito, os níveis de IL-12  
9 variaram de não detectado a 331 pg/ml com mediana de 105,75 pg/ml. Entretanto, após adição dos  
10 parasitos vivos, os níveis foram significativamente maiores, variando de não detectado a 565 pg/ml  
11 com mediana de 221 pg/ml.

12 Não houve diferença significativa entre a síntese de IL-12 antes e depois da adição  
13 parasitos vivos nas culturas de leucócitos. Os níveis de IL-12 sintetizados na ausência de estímulo  
14 variaram de não detectado a 221 pg/ml com mediana de 93,3 pg/ml e na presença de formas  
15 tripomastigotas variou de não detectado a 238 pg/ml com mediana de 153 pg/ml na presença. Estes  
16 resultados são mostrados na figura 4.

17

18

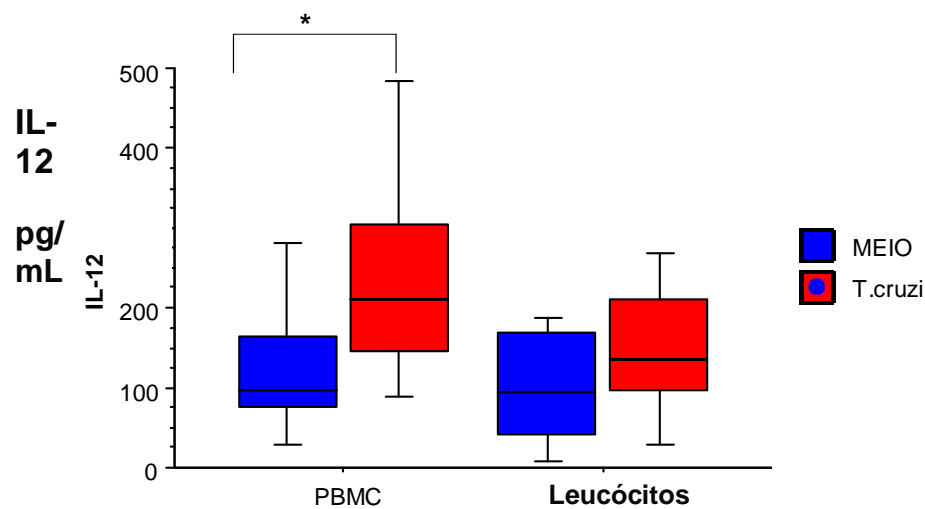


Figura 4: Níveis de IL - 12 produzidos por células mononucleares e leucócitos de indivíduos soro negativos para Doença de Chagas, 18 horas após a infecção com as formas tripomastigotas. \* diferença significativa ( $p < 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25 a 75 % e a linha vertical o percentil de 10 a 90 %.

1

2

3

Os níveis de IL-10 sintetizados por células mononucleares cultivadas na ausência de estímulo com tripomastigotas vivos variaram de não detectado a 3090 pg/ml com mediana de 1470 pg/ml. Nestas mesmas células, após a adição de formas tripomastigotas de *T. cruzi* os níveis variaram de não detectado a 1380 pg/ml com mediana de 353 pg/ml. Desta forma, não foi observado diferença estatística entre os dois grupos.

8

Nas culturas de células do sangue total houve diferença significativa entre os grupos com estímulo e sem estímulo prévio, sendo que após a adição de tripomastigotas, os níveis produzidos variaram de 29,9 pg/ml a 4220 pg/ml com mediana de 946 pg/ml. Em relação á cultura não estimulada, os níveis variaram de 982 pg/ml a 3670 pg/ml com mediana de 928,5 pg/ml.

12

Estes resultados são ilustrados na figura 5.

13

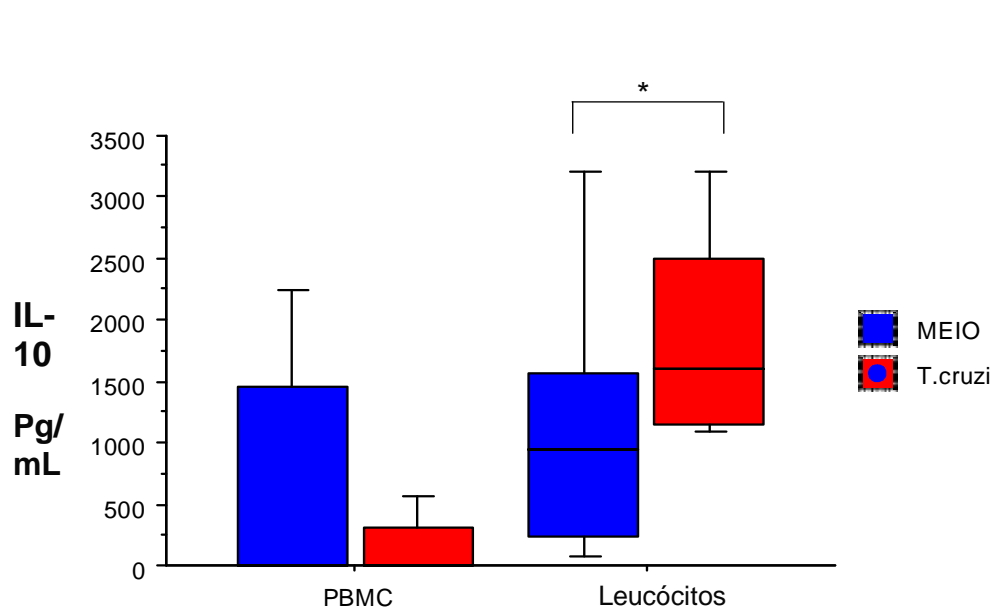


Figura 5: Níveis de IL - 10 produzidos por células mononucleares e leucócitos de indivíduos soro negativos para Doença de Chagas, 18 horas após a infecção com tripomastigotas. \* Sangue total com leucócitos acrescido de meio X Sangue total com leucócitos acrescido de meio mais tripomastigotas ( $p < 0,05$ ), linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25 a 75 % e a leitura vertical o percentil de 10 a 80 %.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14

Houve diferença estatística entre os níveis de TNF- $\alpha$  produzidos por células mononucleares do sangue periférico cultivados na ausência ou na presença de tripomastigotas vivos. Na ausência de estímulo, os níveis de TNF- $\alpha$  variaram de não detectado a 1480 pg/ml com mediana de 521 pg/ml. Nestas mesmas células, após a adição de formas tripomastigotas de *T. cruzi* os níveis variaram de 262 pg/ml a 3420 pg/ml com mediana de 1555 pg/ml.

Nas culturas de células do sangue total, houve diferença significativa com valores significativamente maiores após a adição de tripomastigotas, variando de 36 pg/ml a 1590 pg/ml com mediana de 472 pg/ml, na ausência de estímulo e 262 pg/ml a 3420 pg/ml com mediana de 1555 pg/ml na presença de formas tripomastigotas.

Estes resultados são ilustrados na figura 6.



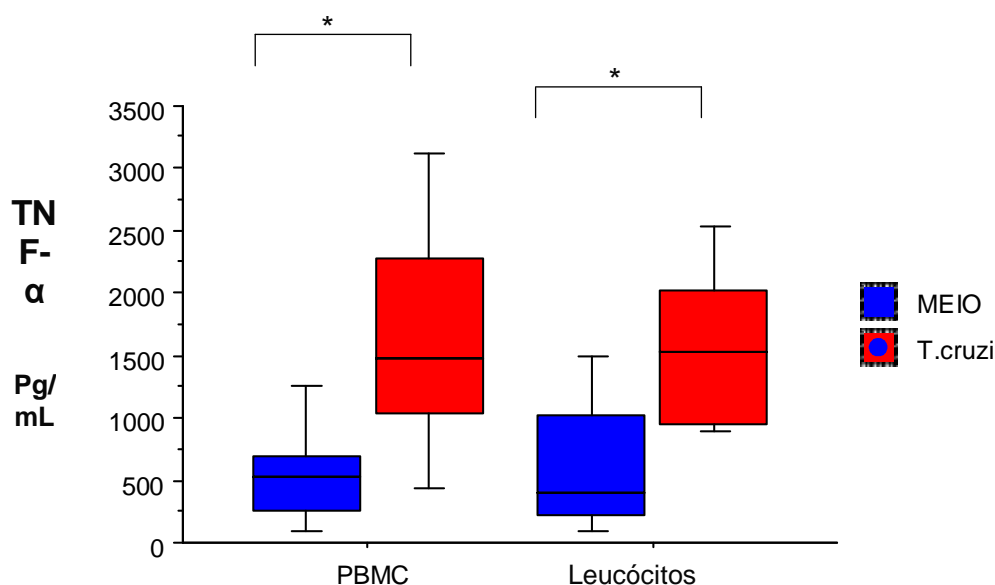


Figura 6: Níveis do TNF- $\alpha$  produzidas por células mononucleares e leucócitos de indivíduos soro negativos para Doença de Chagas, 18 horas após a infecção com tripomastigotas. \* Diferença significativa (Manm Whitney) ( $p < 0,05$ ), linha da horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25 a 75 % e a leitura vertical o percentil de 10 a 90 %.

2

3 Verificamos que na cultura de células mononucleares cultivadas na ausência de  
 4 estímulo prévio com tripomastigotas vivos, os níveis de MIG variaram de 14,5 pg/ml a 36,6 pg/ml  
 5 com mediana de 17,8 pg/ml. Nestas mesmas células, após a adição de formas tripomastigotas de *T.*  
 6 *cruzi* os níveis foram significativamente maiores, variando de 16,7 pg/ml a 71,9 pg/ml com mediana  
 7 de 18,5 pg/ml.

8 Nas culturas de células do sangue total, houve diferença significativa entre o grupo  
 9 com estímulo e sem estímulo, onde níveis superiores de MIG foram produzidos após a adição de  
 10 tripomastigotas, o que variou de 16,2 pg/ml a 71,9 pg/ml com mediana de 19,8 pg/ml na ausência  
 11 de estímulo e 18,9 pg/ml a 127 pg/ml com mediana de 34,15 pg/ml na presença de formas  
 12 tripomastigotas.

13 Estes resultados são ilustrados na figura 7.

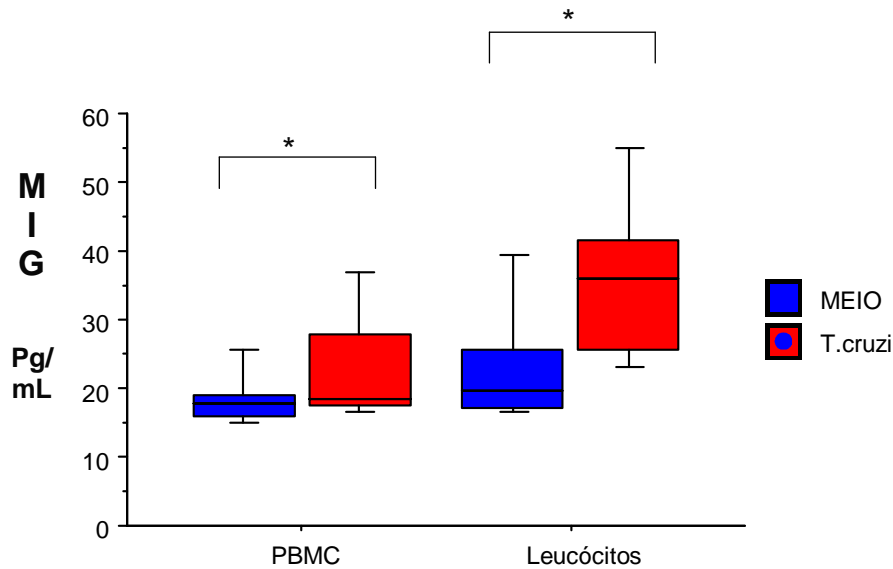


Figura 7: Comparação entre os níveis de MIG produzidas por células mononucleares e leucócitos de indivíduos negativos para Doença de Chagas, 18 horas após a infecção com tripomastigotas. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25 a 75 % e a leitura vertical o percentil de 10 a 90 %.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15

A análise dos níveis de RANTES produzidos por células mononucleares mostrou que não houve diferença estatística entre os grupos estimulados com tripomastigotas e o grupo sem estímulo. Em culturas de PBMC cultivados na ausência de estímulo, os níveis de RANTES variaram de 884 pg/ml a 3600 pg/ml com mediana de 2565 pg/ml. Nestas mesmas células após a adição de formas tripomastigotas de *T. cruzi* os níveis de RANTES variaram de 1400 pg/ml com mediana de 2560 pg/ml.

Nas culturas de células do sangue total não houve diferença significativa entre com estímulo e sem estímulos quanto aos níveis de RANTES produzidos pelas células. Após a adição de tripomastigotas, estes níveis variaram de 2550 pg/ml a 3640 pg/ml com mediana de 2550 pg/ml e na ausência do estímulo variaram de 2230 pg/ml a 3630 pg/ml com mediana de 2550 pg/ml.

1 Estes resultados são ilustrados na figura 8.

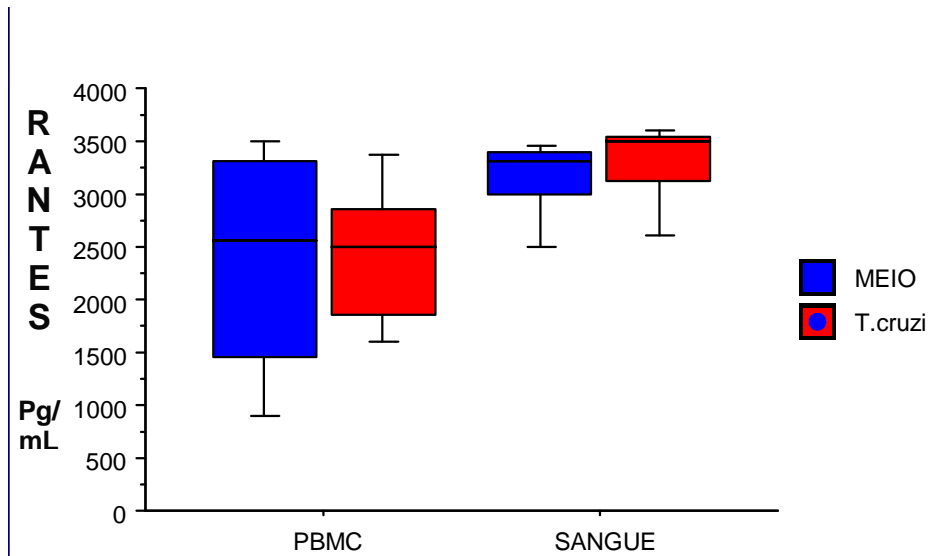


Figura 8: Comparação entre os níveis de RANTES produzidas por células mononucleares e leucócitos de indivíduos soronegativos para Doença de Chagas, 18 horas após a infecção com tripomastigotas. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25 a 75 % e a leitura vertical o percentil de 10 a 90 %.

2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14

Os níveis de MIP-1 $\alpha$  produzidos por PBMC cultivados na ausência de estímulo variaram de 1780 pg/ml a 4160 pg/ml com mediana de 3110 pg/ml. Nestas mesmas células, após a adição de formas tripomastigotas de *T. cruzi* não houve diferença significativa com níveis variando de 1210 pg/ml a 4240 pg/ml com mediana de 3205 pg/ml. Analisando as culturas de células do sangue total, verificou-se que não houve diferença significativa após a adição de tripomastigotas. Os níveis de MIP-1 $\alpha$  no sobrenadante das culturas na ausência de estímulo variaram de 2860 pg/ml a 4020 pg/ml com mediana de 3510 pg/ml e na presença de estímulo com tripomastigotas vivos variaram de 3020 pg/ml a 4420 pg/ml com mediana de 3625 pg/ml.

Estes resultados são ilustrados na figura 9.

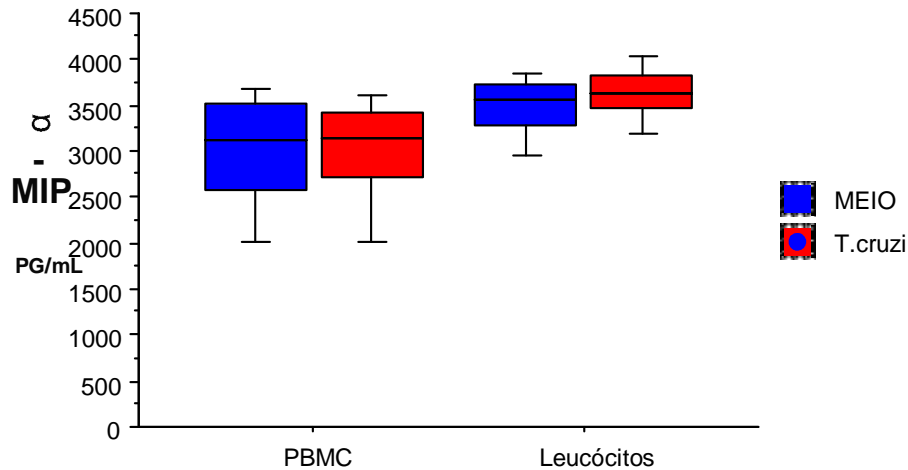


Figura 9: Comparação entre os níveis de MIP - 1  $\alpha$  produzidas por células mononucleares e leucócitos de indivíduos soros negativos para Doença de Chagas, 18 horas após a infecção com tripomastigotas. Sangue total com leucócitos acrescido de meio. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25 a 75 % e a leitura vertical o percentil de 10 a 90 %.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12

Os níveis de MCP-1 em sobrenadante de cultura de PBMC cultivados na ausência de estímulo variaram de não detectado a 1630 pg/ml com mediana de 879 pg/ml. Nestas mesmas células, após a adição de formas tripomastigotas de *T. cruzi* os níveis não foram significativamente, variando de não detectado a 693 pg/ml com mediana de 335,5 pg/ml. Nas culturas de células do sangue total não verificou-se diferença significativa entre os níveis de MCP-1 produzidos. Após a adição de tripomastigotas os níveis variaram de não detectado a 1250 pg/ml com mediana de 679 pg/ml e na ausência de estímulo os níveis variaram de 15,1 pg/ml a 1660 pg/ml com mediana de 697,5 pg/ml. Estes resultados são ilustrados na figura 10.

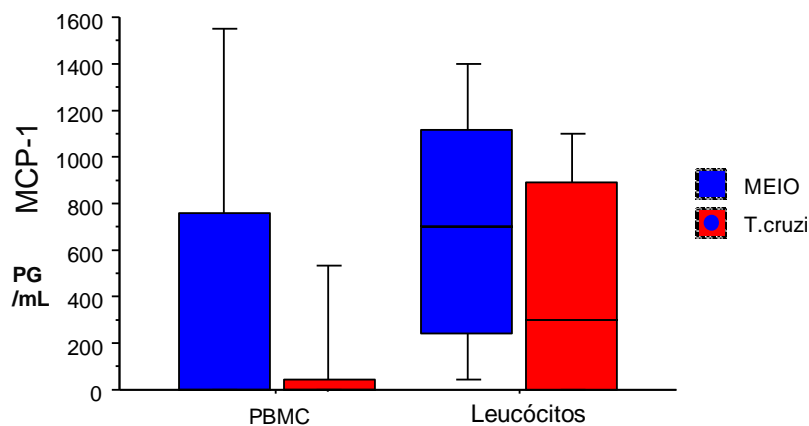


Figura 10: Comparação entre os níveis de MCP-1 produzidas por células mononucleares e leucócitos de indivíduos soro negativos para Doença de Chagas, 18 horas após a infecção com tripomastigotas. Sangue total com leucócitos acrescido de meio X Sangue total com leucócitos acrescido de meio mais tripomastigotas ( $p < 0,05$ ), linha da horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25 a 75 % e a leitura vertical o percentil de 10 a 80 %.

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

Os níveis de nitrito detectados nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares sem estímulo prévio variaram de 14 nMol a 31 nMol com mediana de 22 nMol. Nestas mesmas células, após a adição dos parasitos os níveis variaram de 12 nMol a 28 nMol com mediana de 21 nMol, não havendo diferença estatística entre os dois grupos.

Nas culturas de células do sangue total, não se observou diferença significativa entre os grupos com estímulo e sem estímulo. Após a adição de formas tripomastigotas, os níveis de nitrito detectados variaram de 23 nMol a 6400 nMol com mediana de 1310 nMol sendo que os níveis detectados na ausência de estímulo variaram de 28 nMol a 7620 nMol com mediana de 1500 nMol. Estes resultados são ilustrados na figura 11.

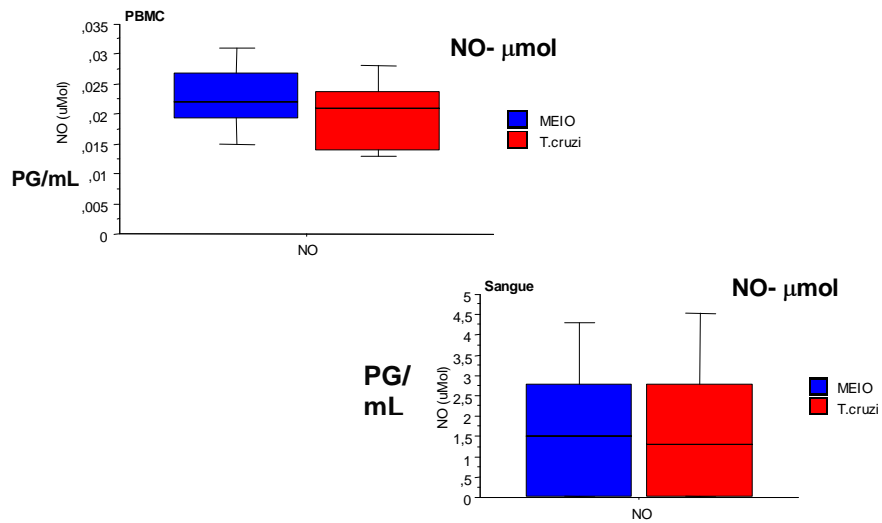


Figura 11 : Comparação entre os níveis de nitrito produzidos por células mononucleares e leucócitos de indivíduos soros negativos para Doença de Chagas, 18 horas após a infecção com tripomastigotas. Sangue total com leucócitos acrescido de meio X Sangue total com leucócitos acrescido de meio mais tripomastigotas, linha da horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25 a 75 % e a leitura vertical o percentil de 10 a 80 %.

## 1 **6- DISCUSSÃO**

---

2

3 Células da resposta imune inata são as primeiras células a serem recrutadas no  
4 sítio de infecção e pouco se conhece do resultado da interação destas células com formas  
5 tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

6

7 Moléculas de superfície do *T. cruzi* podem induzir a produção de citocinas e  
8 quimiocinas por células da resposta imune inata, provavelmente através da ativação de  
9 Receptores Toll-Like (TLR) modulando a resposta imunológica contra este parasito  
10 (Almeida e Gazzinelli, 2001; Campos e col., 2001; Coelho e col., 2002; Medeiro e col.,  
2007).

11

12 Neste estudo, analisamos a produção de citocinas (IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10) e  
13 quimiocinas (MIG, MCP-1, RANTES e MIP-1  $\alpha$ ), bem como óxido nítrico por células  
14 mononucleares e do sangue total envolvidos na regulação da resposta imune inata antes e  
15 após o estímulo com formas tripomastigotas vivas de *T. cruzi*.

16

17 Nosso trabalho demonstrou que o estímulo com tripomastigotas vivos de *T.*  
18 *cruzi* induziu o aumento da síntese de IL-12 nas culturas de células mononucleares.  
19 Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos com estímulo e sem estímulo  
20 nas culturas de células do sangue total.

21

22 O papel desenvolvido pelas citocinas pró e antiinflamatórias na patogênese da  
23 Doença de Chagas é extremamente importante para a modulação da resposta imune.  
24 Formas tripomastigotas de *T. cruzi* são capazes de induzir significativamente a produção  
25 de IL-12 por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos normais,  
26 provavelmente devido à habilidade das glicoproteínas do tipo mucina de tripomastigotas se  
27 ligarem a receptores específicos na célula hospedeira e induzirem a produção desta citocina  
(Camargo, 1997).

28

29 Sabe-se que a IL-12 é uma citocina importante para estimular a produção de  
30 IFN- $\gamma$  e diferenciação de células T em Th1. Assim, a IL-12 passa a ser considerada

1 essencial para o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva contra patógenos  
2 intracelulares. Uma maneira eficiente de se escapar da destruição pelo sistema de defesa do  
3 hospedeiro passa a ser o controle da expressão de IL-12 pelo parasito. A influência da IL-  
4 10, IL-12 e do IFN- $\alpha$  e do IFN- $\gamma$  na regulação autócrina de macrófagos tem sido  
5 amplamente descrita (Di Marzo, 1994; Bastos e col., 2002). Esta citocina pode ainda  
6 influenciar na capacidade de apresentação de antígeno pelos macrófagos peritoneais, uma  
7 vez que o tratamento destas células com rIL-12 potencializa a apresentação de um antígeno  
8 tumoral pouco imunogênico (Grohmann, e cols. 2001).

9 Não observamos diferença significativa entre os grupos sem estímulo e com  
10 estímulo em relação aos níveis de IL-10 produzidos por células mononucleares.  
11 Entretanto, o estímulo com tripomastigotas induziu aumento da síntese de IL-10 por  
12 células do sangue total.

13 A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória produzida por macrófagos e por alguns  
14 linfócitos. Esta citocina inibe a produção de IFN- $\gamma$  pelo linfócito T e de várias citocinas e  
15 quimiocinas pelos macrófagos, bloqueando as funções acessórias destas células na ativação  
16 de células T (Trinchieri, 1997). IL-10 pode diminuir a liberação dos metabólicos tóxicos e  
17 inibir a diferenciação de células Th1, caracterizando um parasitismo sustentado (Reed e  
18 cols., 1994; Abrahamsohn, 1998; Brodskyn & Barral-Neto, 2000).

19 Apesar de detectarmos altos níveis de IL-10 em culturas de células do sangue total  
20 infectadas com tripomastigota da cepa Y de *T. cruzi* (de natureza virulenta e patogênica),  
21 alguns autores consideram que a indução da síntese de IL-10 pelo parasito seja um  
22 mecanismo de escape da resposta imune, embora essa síntese não esteja diretamente  
23 relacionada com a virulência do parasito e a alta produção da mesma não tem um papel na  
24 persistência do mesmo na célula hospedeira (WILLE e cols., 2001).



1           Em nosso estudo observou-se que a adição de tripomastigotas na cultura  
2 induziu aumento da síntese de TNF- $\alpha$  nas culturas de células mononucleares e de sangue  
3 total.

4           TNF- $\alpha$  é uma citocina que atua em processos inflamatórios e imunes, também  
5 regula o crescimento e diferenciação em alguns tipos celulares. Apresentam efeitos  
6 parácrinos e endócrinos, liberado por macrófagos e monócitos ativados, linfócitos T e B,  
7 fibroblastos e miocardiócitos (Finkel e col., 1992; Machado e col., 2000). Pode ainda atuar  
8 na ativação da iNOS induzindo a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, importante  
9 mecanismo de destruição do parasito intracelular (Silva e col., 1995).

10           A produção do TNF- $\alpha$  pode ser induzida diretamente pelo parasito ou por seus  
11 antígenos de superfície, sendo dependente da ativação do fator de transcrição NF-kB, como  
12 mostrado por Ropert e col. (2002).

13           As quimiocinas são substâncias quimioattractantes produzidas pelo organismo que  
14 atuam na modulação e controle da resposta imunológica através de diferentes células da  
15 resposta imune inata e adaptativa.

16           De modo geral, as CXC quimiocinas atuam sobre os neutrófilos e as células T e B,  
17 enquanto as CC quimiocinas atuam sobre um espectro mais amplo de populações celulares,  
18 como monócitos, basófilos, eosinófilos, células T, células dendríticas e células natural  
19 killer, não atuando sobre os neutrófilos. Provavelmente todos os tipos celulares, como  
20 células endoteliais, cardiomiócitos, fibroblastos, megacariócitos, células T, macrófagos,  
21 etc, quando estimulados de forma apropriada e dependente da natureza do estímulo  
22 produzem vários tipos de quimiocinas simultaneamente (Denney *e col.* 1999).

23           Macrófagos humanos infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* são capazes  
24 de produzir algumas quimiocinas como: CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$   
25 and CCL2/MCP-1 (Villalta e col. 1998, Aliberti e col. 1999). Em nosso estudo verificamos  
26 que nas culturas de células mononucleares e de células do sangue total os níveis de MIG

1 foram estatisticamente significativos entre os grupos sem estímulo prévio com  
2 tripomastigota em relação ao grupo com estímulo, o qual produziu maior quantidade desta  
3 quimiocina. Trabalho anterior mostrou que pacientes com a forma esofágica da doença de  
4 Chagas produziam maiores níveis de MIG em relação ao pacientes que apresentavam  
5 apenas refluxo gastroesofágico. Além disso, outro estudo mostrou que níveis elevados de  
6 MIG foram detectados em pacientes que apresentavam a forma cardíaca da doença quando  
7 comparados aos níveis detectados em soro indivíduos saudáveis. Estes dois trabalhos  
8 mostram o importante papel de MIG no controle da infecção por *T. cruzi* (Talvani e col.,  
9 2004; Crema e col., 2006).

10 Trabalho realizado por Coelho e col. (2002) demonstrou que importante papel  
11 das moléculas (tGPI) de *T. cruzi* que estão ancoradas na membrana do parasito no  
12 recrutamento de diferentes células da resposta imune em camundongos. Macrófagos  
13 quando ativados pelo parasito sintetizam IFN-gama o qual induz a produção de MCP-1  
14 por estas células. Neste trabalho, os autores demonstram a importância desta quimiocina  
15 no recrutamento de leucócitos *in vivo* e ativação de macrófagos *in vitro*. M nosso estudo,  
16 níveis significativos de MCP-1 foram sintetizados por células mononucleares e por  
17 células do sangue total após a adição do parasito em cultura, o que comprova o papel desta  
18 quimiocina na regulação da infecção pelo *T. cruzi*.

19 Não foi detectada diferença estatística quanto aos níveis de RANTES e MIP-1  
20 alfa produzido pelas culturas de ambas as células antes a após estímulo com  
21 tripomastigotas. Embora essa diferença não exista, sabe-se que estas duas quimiocinas  
22 participam ativamente do processo de fagocitose por macrófagos ativados por pelo  
23 parasito, além de induzir a cascata de ativação que promove a expressão de moléculas de  
24 superfície de macrófagos importantes para o reconhecimento de antígenos de superfície do  
25 parasito por estas células (Lima e al., 1997; Villalta e cols., 1998; Villalta e cols., dados  
26 não publicados).

1           Foi demonstrado que a infecção experimental de camundongos com a cepa  
2 Colombiana pode agir na regulação de quimiocinas e conseqüentemente na modulação da  
3 resposta imunológica nas fases da doença em coração e em macrófagos. A análise dos  
4 RNAm de quimiocinas mostra que as quimiocinas CXCL9 (MIG) e CXCL10 (IP10), bem  
5 como CCL2 (MCP-1) e CCL5 (RANTES) foram expressas durante a fase aguda da doença  
6 de Chagas, entretanto, os transcritos para CCL9, CCL10 e CCL5 permaneceram elevados  
7 durante a fase crônica da doença (Hardison e cols., 2006). Este dado demonstra que as  
8 quimiocinas podem participar do direcionamento da resposta imune inata para resposta  
9 imune adaptativa.

10           Óxido nítrico é uma substância capaz de inibir o crescimento ou eliminar  
11 diversos tipos de microorganismos. Sua síntese pode ser regulada pela ação sinérgica entre  
12 duas citocinas, IFN-gama e TNF-alfa, favorecendo a eliminação de parasitos como *T. cruzi*  
13 via macrófagos humanos (Muñoz-Fernandez e col., 1992; Gazzinelli e col., 1992; James,  
14 1995, Villalta e col. 1998) demonstrou através de infecção de macrófagos humanos com  
15 tripomastigotas da cepa Tulahuen que quimiocinas do grupo CC como RANTES, MIP-1a e  
16 MIP-1b desempenham papel tripanocida importante através da indução da síntese de NO.

17           Em nosso estudo, os níveis de nitrito detectados nas culturas de PBMC foram  
18 baixos e não houve diferença significativa entre os níveis produzidos pelas culturas de  
19 células mononucleares e células do sangue total antes e após o estímulo com formas  
20 tripomastigotas de *T. cruzi*.

21           Os níveis de TNF- $\alpha$  observados após a adição do parasito em ambas as culturas de  
22 células tenha sido elevado, este isoladamente não foi capaz de estimulas a produção de  
23 NO. Considerando o papel desta citocinas na regulação da síntese de nitrito por células da  
24 resposta imunológica, é possível que os baixos níveis de nitrito obtidos nas culturas de  
25 PBMC possam ser atribuídos à baixa capacidade destas células expressarem iNOS.

1                    Estes resultados mostram que o parasita, ao entrar em contato com células da  
2 Resposta Imune Inata, é capaz de ativá-las na liberação de mediadores, quimiocinas e  
3 citocinas, com potencial par iniciar a resposta imune antiparasitária e influenciar o  
4 desenvolvimento da resposta imune adaptativa.

## 1 **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

2

3

4

5

6

7

8

9

10 Os nossos resultados nos permitem concluir que:

11

12

13

14

15

16

A interação existente entre o *T. cruzi* e a célula hospedeira pode envolver moléculas de superfície especializadas capazes de induzir a ativação de vias de sinalização importantes para o desencadeamento da Resposta Imune Inata necessária para controlar a replicação do parasito nos momentos iniciais da infecção. Alguns destes mediadores são ainda decisivos para o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa, que determinará, tanto os mecanismos de combate ao parasita, como aqueles envolvidos na formação das lesões da fase crônica da doença e Chagas.

■ O contato de formas tripomastigotas vivas com as células da resposta imune inata, levou ao aumento da expressão de mediadores que atuam de forma oposta na regulação da resposta imune.

■ O resultado deste balanço poderia ser decisivo para o desenvolvimento da infecção.

■ Outros estudos são necessários para melhor compreender os fenômenos aqui evidenciados.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4ª ed. 4 Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do Sistema Imune**. Rio de Janeiro: Revinter. 2003

ABRAHAMSOHN, I.A. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz J Med Biol Res.**, v. 31, n. 1, p. 117-21, 1998.

ABUIN, G; COLLI.; DE SOUZA, W.; ALVES, M.J.M. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and Molecular constitution. **Mol. biochem. Parasitol.**, v. 35, p. 229-237, 1989.

ACOSTA-SERRANO, A.; ALMEIDA, I.C.; FREITAS-JUNIOR, L.H.; YOSHIDA, N.; SCHENKMAN, S. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. **Mol Biochem Parasitol**. May;14(2):143-150. 2001. Review.

ALMEIDA, I.C.; GAZZINELLI, R.T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. **J Leukoc Biol** 70: 467-477. 2001.

ALIBERTI, J. C. S.; CARDOSO, M. A. G.; MARTINS, G. A.; GAZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q.; AND SILVA, J. S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect. Immun.**, v.64, p.1961–1967, 1996.

ALIBERTI, J.C.S.; MACHADO, F.S.; SOUTO, J.T.; CAMPANELLI, A.P.; TEIXEIRA, M.M.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S.  $\beta$ -chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**, v.67, p.4819–4826, 1999.

ALIBERTI, J. C. S.; SOUTO, J.T.;MARINO, A.P.; LANNES-VIEIRA, J.; TEIXEIRA, M.M.; FARBER, J.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. Modulation of Chemokine Production and Inflammatory Responses in Interferon-g- and Tumor Necrosis Factor-R1-Deficient Mice during *Trypanosoma cruzi* Infection. **Am. J. Pathol.**, v. 158, n. 4, 2001.

ALIBERTI, J.C.; MACHADO, F.S.; GAZZINELLI, R.T.; TEIXEIRA, M.M.; SILVA, J.S. Platelet-activating factor induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages and mediates resistance to parasite infection in mice. **Infect Immun.** Jun;67(6):2810-2814. 1999

ALVES, M. J.M.; COLLI, W. Glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*: Partial purification by gel chromatography. **FEBS. Lett.**, v.52, p.188-192, 1975.

ANDRADE, Z. A. Mechanisms of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection. **Ciba Found Symp 99**: 214-233., 1983.

ANDRADE, Z. A. Fisiopatogenia da doença de Chagas. **Revista de Patologia Tropical** , 29 (supl.): 131- 140, 2000.

ANDREWS, N. W. Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship.Review.**The J.of Cell Biology**, v.158, n.3, p. 389–394, 2002.Review

ARAÚJO-JORGE, T.C.; LAGE, M.J.; RIVERA, M.T.; CARLIER, Y.;VAN-LEUVEN, F. *Trypanosoma cruzi*: enhanced alpha-macroglobulin levels correlate with the resistance of BALB/cj mice to acute infection. **Parasitol. Res**, Rio de Janeiro, v.78,n.3, p.215-221,1992.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; GOMES, J. A.; ROCHA, M. O.; MOREIRA, M. C ; LEMOS, E. M.; LUZ, Z. M.; PEREIRA, M. E.; COFFMAN, R. L.; DIAS, J. C.; CANÇADO, J. R.; GAZZINELLI, G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology. **Braz J Med Biol Res**, v.31, n.1, p.127-31. Jan, 1998.

BASTOS, K. R. B.; ALVAREZ, J. M.; MARINHO, C. R. F.; RIZZO, L. V.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R. Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile. **J. Leukoc. Biol**, v.71, p.271-278. 2002.

BRANDONISIO, T. M.; BACHMAN, J. A.; SEARS, J. M. Atopic dermatitis: a case report and current clinical review of systemic and ocular manifestations. **Illinois College of Optometry, Illinois Eye Institute**, Chicago, USA, v.72, n.2, p. 94-102, feb.2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 4. ed. ampl.– **Brasília: Ministério da Saúde, 2004**. 332 p.: il. color. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. (Org.) - *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1979.

BRENER, Z.; KRETTLI, A. U. Immunology of Chagas' disease. In WYLER, D. J. **Modern Parasite Biology. Cellular, immunological and molecular aspects**. USA: 1990 p. 247-261.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int. Arch. Allergy. Immunol.**, v.114, n. 2, p.103-10, 1997.

BRODSKYN, C. I.; BARRAL-NETTO, M. Resposta Imune Humana na Doença de Chagas. **Trypanossoma cruzi e Doença de Chagas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. p.170-176.2000.

CAMARGO, M.M.; ALMEIDA, I.C.; PEREIRA, M.E.; FERGUSON, M.A.; TRAVASSOS, L.R.; GAZZINELLI, R.T. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. **J Immunol**. v. 15, n.158 :5890-5901. Jun. 1997.

CAMPOS, M. A.; ALMEIDA, I. C.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; VALENTE, E. P.; PROCOPIO, D. O.; TRAVASSOS, L. R.; SMITH, J.A.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Activation Of Toll-Like Receptor-2 by Glycosylphosphatidylinositol Anchors From A Protozoan Parasite. **J. Immunol.**, v.167, n.1, p.416-423, 2001.

CAMPOS, M. A.; GAZZINELLI, R. T. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-Like receptors. **Mediators Inflamm**, v.13, n.3, p.139-43, jun. 2004. Review.



CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J. C.; REED, S. G.; SILVA, J. S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: Role of NK cells. **Infect Immun**, v.64, n.1, p.128-34, jan.1996.

CARLIER, Y; TORRICO, F: Congenital infection with *T. Cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 36, n.6, p.767-771, 2003.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 1, n.2, p.159-218, 1909.

CHANDRASEKAR, B. ; MELBY, P. C. ; TROYER, D. A. ; COLSTON, J. T. ; FREEMAN, G. L. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. **Am J Pathol**, v.152, n.4, p. 925–934, April, 1998.

COELHO, P. S.; KLEIN, A; TALVANI, A.; COUTINHO, S. F.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; SILVA, J. S.; CANIZZARO, H.; GAZZINELLI, R. T.; TEIXEIRA, M. M. Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Mucin-Like Glycoproteins Isolated From *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-Primed-Macrophages. **J Leukoc Biol**.,v.71, n.5, p.837-844, 2002.

COURA, J. R.; ABREU, L.; PEREIRA, J. B.; WILCOX, H. P. Morbidade da doença de Chagas. IV Estudo longitudinal de 10 anos em Pains e Iguatama, Minas Gerais. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 18, n.2, p. 09-98, 1966.

DE CARVALHO, T. U. **Adesão, reconhecimento, sinalização e invasão**. Programa de Biofísica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 2008..

CREMA, E.; MONTEIRO, I. de O.; GOMES, M.G.; SILVA, A. A.; RODRIGUES JÚNIOR, V. Evaluation of cytokines (MIG, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, and IL-10) during the different evolutive phases of chagasic esophagopathy. **Clinical Immunology**, V.119, n. 2, p.213-218, may. 2006

DE DIEGO, J.; PUNZON, C.; DUARTE, M.; FRESNO, M. Alteration of macrophage function by a *Trypanosoma cruzi* membrane mucin. *J Immunol.*, v.159, n.10, p.4983-4989, 1997.

DESSEIN, A. ; KOURIBA, B. ; EBOUMBOU, C. ; DESSEIN, H. ; ARGIRO, L. ; MARQUET, S. ; ELWALI, N. E. ; RODRIGUES JR, V. ; LI, Y. ; DOUMBO, O. ; CHEVILLARD, C. Interleukin-13 in the skin and interferon- $\gamma$  in the liver are key players in immune protection in human schistosomiasis. **Immunological Reviews**, v.201 n.1, p.180 - 190, sep. 2004.

De SOUZA, W. O. PARASITO E SUA INTERAÇÃO COM OS HOSPEDEIROS. In: **BRENNER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M.** *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 88-126

DENG, C.; RADU, C.; DIAB A.; TSEN M. F.; COWDERY, R. J. S.; RACKE M. K.; THOMAS, J. A. IL-1 receptor-associated kinase-1 regulates susceptibility to organ-specific autoimmunity. **J Immunol.**;170(6):2833-2842. Mar. 2003.

DENNEY, C.F.; ECKMANN, L.; REED, S.L. Chemokine secretion of human cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. **Infect Immun.**v. 4 n. 67(4) :1547-1552. Abr. 1999.

DI MARZO, P.;PUDDU, P.; CONTI, L.; BELARDELLI, F.; GESANI, S. Interferon- $\gamma$  up-regulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages. **J. Exp. Med.**, v.179, p.1731-1736, 1994.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. In: BRENNER, Z; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M.. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.48-50.

DIAS, E; LARANJA, F, S; NOBREGA, G. **Doença de Chagas**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.43, n.3, p.495-581, dez. 1945.

DORTA, M. L.; FERREIRA, A. T.; OSHIRO, M. E. M.; YOSHIDA, N.  $Ca^{+2}$  signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.73, p.285-289, 1995.

DOS REIS, G. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol Today**, v.13, p.335-342, 1997.

DOS SANTOS, R.R.; ROSSI, M.A.; LAUS, J.L.; SILVA, J.S.; SAVINO, W.; MENGEL, J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Exp Med.**, v.175, n.1, p.29-39. Jan.1992.

DOS SANTOS, P.V.; ROFFÊ, E.; SANTIAGO, H.C.; TORRES, R.A.; MARINO, A.P.; PAIVA, C.N.; SILVA, A.A.; GAZZINELLI, R.T.; LANNES-VIEIRA, J. Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. **Microbes Infect.**, v.3, n.12, p.971-84, oct. 2001.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Some Aspects of Protozoan Infections in Immunocompromised Patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 4, 2002.

FERREIRA, R.C.; IANNI, B.M.; ABEL, L.C.; BUCK, P.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98, n.3, p.407-11, 2003.

FILISSETTI, D.; MOHAMED G.; ELODIE PERNOT-M.; ODILE V.; ERMANNO C. Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Comparison of Targets for Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR. **J. Clin Microbiol.**, v.41, n.10, p.4826-4828, oct. 2004.

FINKEL, M.S.; ODDIS, C.V.; JACOB, T.D.; WATKINS, S.C.; HATTLER, B.G.; SIMMONS, R.L.; Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. **Science**. v. 17, n. 257(5068):387-389. Jul. 1992.

FRESNO, M.; KOPF, M. ;RIVAS, L. **Immunology Today**, v.18, n.2, p.56-58, Feb.1997.

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

GAZZINELLI, R.T.; DENKERS, E.Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nat Rev Immunol.** V. 6., n.12, p-895-906. Epub 2006 Nov 17. Review.

GIORDANO, R.; CHAMMAS, R.; VEIGA, S.S.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M. An acid component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 65, p.85-94, 1994.

GOLGHER, D.B.; COLLI, W. SOUTO-PADRON, T.; ZINGALES, B. Galactofuranose-containing glycoconjugates of epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol.** V.2, n. 40 :249-264. Aug. 1993.

GOMES, J.A.S.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; ROCHA, M.O.C.; MARTINS-FILHO, G. A.; GAZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas` disease is due to th1-specific immune response. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 1185-1193, 2003.

GOMES, N.A; PREVIATO, J.O; ZINGALES, B; MENDONÇA-PREVIATO, L.; DOS REIS, G.A. Down regulation of T lymphocyte activation in vitro and in vivo induced by glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* : assignment of T cell- suppressive determinant to the ceramide domain. **J. Immunol.**, v.119, p.465-470, 1995.

GRAÇA. L, C.; LOUREIRO, F.; GARÇÃO, V. ALVES.; SANTOS, M.; CHIEIRA, R.C. .Avaliation of the immunological response to the specific nasal challenge test: chemokine study in nasal secretions. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia** 2003; XI : 380-390

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate biosynthesis in germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p.56-68, 1981.

GROHMANN, U.; BELLADONNA, M.L.; VACCA, C.; BIANCHI, R.; FALLARINO, F.; ORABONA, C.; FIORETTI, M.C.; PUCCHETTI, P. Positive regulatory role of IL-12 in macrophages and modulation by IFN-gamma. **J Immunol.** v.1 , n. 167 :221-227. Jul. 2001.

GUTHER, M. L. S.; CARDOSO DE ALMEIDA, M. L; YOSHIDA, N; FERGUSON, M. A.J. Structural studies on the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma cruzi* 1G7- antigen. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.6820, 1992.

HARDISON, J. L.; WRIGHTSMAN, R. A.; CARPENTER, P. M.; LANE, T. E.; and MANNING, J. E. The Chemokines CXCL9 and CXCL10 Promote a Protective Immune Response but Do Not Contribute to Cardiac Inflammation following Infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun.** v. 1, n. 74: 125–134. Jan. 2006.

HEISE, N.; RAPER, J.; BUXBAUM, L. U; PERANOVICH, T. M. S; CARDOSO DE ALMEIDA, M.L. Identification of complete precursors for the glycosylphosphatidylinositol protein anchors of *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.** v. 271, p.16877-16887, 1996.

HIGUCHI, M.D.E. L.; GUTIERREZ, P.S.; AIELLO, V.D.; PALOMINO, S.; BOCCHI, E.; KALIL, J.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.** v. 3 n. 423 :157-160.1993.

HIGUCHI, M. D.; RIES, M.M.; AIELLO, V.D.; BENVENUTI, L.A.; GUTIERREZ, P.S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. **Am J Trop Med Hyg.** v.5, n. 56:485-489. Mai. 1997.

HIROAKI, H.; OSAMU, T.; TARO, K.; TSUNEYASU, K.; SHINTARO, S.; HIDEKI, S.; MAKOTO, M.; KATSUAKI, H.; HERMANN, W.; KIYOSHI, T.; AND SHIZUO, A. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, 740-745. December 2000.

JAMES, D.C.; FREEDMAN, R.B.; HOARE, M.; OGONAH, O.W.; ROONEY, B.C.; LARIONOV, O.A.; DOBROVOLSKY, V.N.; LAGUTIN, O.V.; JENKINS, N. N-glycosylation of recombinant human interferon-gamma produced in different animal expression systems. **Biotechnology (N Y).** n. 13, v. 6 :592-596. Jun. 1995.

JANEWAY, C. A. JR. How the immune system protects the host from infection. **Microbes Infect.** v. 3, n.13 :1167-1171. 2001;Review.

JONES, E.M.; COLLEY, D.G.; TOSTES, L., E. R.; VENENCAB-JONES, Mc.; CURLEY, T.L. Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 48: 348-357, 1993.

KANAE, O.; and HIROAKI, K. A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network. **Molecular Systems Biology** n:15, 2006.

KUMAR, S. TARLETON, R.L. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.** v.5, n. 20 :207-216.Mai. 1998.

LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; RAMIREZ, L. E.; MACEDO, A.M.; PENA, S.D.; CHIARI, E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. **Am J Trop Med Hyg.** n. 65: 435-441 2001.

LAUCELLA, S. A.; MIRIAM, P. D.; MARTIN, B. H.; FRALISH, M. C.; ALBAREDA, M. G.; ALVAREZ, B. L.; BARBIERI, G.; VIOTTI, J. R.; and TARLETON, R. L. Frequency of Interferon- $\gamma$ -Producing T Cells Specific for *Trypanosoma cruzi* Inversely Correlates with Disease Severity in Chronic Human Chagas Disease. **The Journal of Infectious Diseases** v.5 n.189, 909-918. 2004

LEDERKREMER, R.M.; CASAL, O. L.; TANAKA, C.T.; COLLI, W. A. Lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* (epimastigota). Isolation, purification and carbohydrate composition. **Biochem. Biophys. Acta**, v.44, p.85-96, 1976.

LEDERKREMER, R.M; CASAL, O. L; TANAKA, C.T.; COLLI, W. Ceramide and inositol content of the lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.85, p.1268-1274, 1978.

LEDERKREMER, R.M; CASAL, O. L; TANAKA, C.T.; COLLI,W..Evidence for the presence of D-galactofuranose in the lipopeptidophosphoglycan of *Trypanosoma cruzi*. **FEBS Lett.**, v.116, p.25-29, 1980.

LIEBERMAN, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. **Nat Rev Immunol.** n.3: 1-12.2003.

LIMA, M.F.; ZHANG, Y.; VILLALTA, F. Beta-chemokines that inhibit HIV-1 infection of human macrophages stimulate uptake and promote destruction of *Trypanosoma cruzi* by human macrophages. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**.v. 7, n.43 :1067-1076. Nov.1997.

LONSDALE-ECCLES, J.D.; MPIMBAZA, G.W.; NKHUNGULU, Z.R.; OLOBO, J.; SMITH L.; TOSOMBA, O.M.; GRAB, D.J. Trypanosomatid cysteine protease activity may be enhanced by a kininogen-like moiety from host serum. **J. Biochem.**, v. 15; p.549-556, 1995.

LOPES, M. F.; DOS REIS, G. A. Trypanosoma cruzi-induced immunosuppression: blockade of costimulatory T-cell responses in infected hosts due to defective T-cell receptor-CD3 functioning. **Infect Immun.** v. 62; p.1484–1488, 1994

LOPES, M. F.; DOS REIS, G. A. *Trypanosoma cruzi* induced immunosuppression selective triggering of CD4 T cell death by the cell receptor CD<sub>3</sub> pathway and not by the CD<sub>9</sub> or Ly 6 activation pathway. **Infect. Immun.** v.64, p.1559-1564, 1996.

MACHADO, F.S.; MARTINS, G.A.; ALIBERTI, J.C.S.; MESTRINER, F.L.A.C.; CUNHA, F.Q. *Trypanosoma cruzi* infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent NO-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, v. 102, p. 3003-3008, 2000.

MAGDESIAN, M. H.; GIORDANO, R.; ULRICH, H.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; SCHUMACHER, R.I.; COLLI, W.; ALVES, M.J. Infection by *Trypanosoma cruzi* Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. **J Biol Chem.** v. 22, n. 276:19382-19389. Jun. 2001.

MARY, C. ; AURIAULT, V.; FAUGERE, B .; DESSEIN, A.J. Control of Leishmania infantum infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigen-specific T cells. **Infect Immun.**v. 11, n. 67:5559-5566. Nov.1999.

MARTINS, G.A.; VIEIRA, L. Q.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. Gamma interferon Modulates CD95 (Faz) and CD 95 ligant (Faz-L) Expression and Nitric Oxide- Induced Apoptosis during the Acute Phase of *Trypanossoma cruzi* Infection: a Possible Role in Immune Response Control. **Infect. Immun**, v. 67, n.8, p. 3864-3871, 1999.

MARTINS M.S.; HUDSON, L.; KRETTLI, A.U.; CANÇADO, J.R.; BRENER, Z. Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Clin Exp Immunol.** v. 2, n.61 :343-350 Aug.1985.

MEDEIROS, M.M.; PEIXOTO, J. R.; OLIVEIRA, A-C.; CARDILO-REIS, L.; . KOATZ, V. L. G.; VAN KAER, L.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; NÓBREGA, A.; AND BELLIO, M. Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent proinflammatory and immunomodulatory properties of the glycoinositolphospholipid (GIPL) from *Trypanosoma cruzi*. **J. Leukoc. Biol.** N. 82: 488-496. Mai. 2007.

MEIRELLES, M.N.; JULIANO, L.; CARMONA, E.; SILVA, S.G.; COSTA, E.M.; MURTA, A.C.; SCHARFSTEIN, J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol Biochem Parasitol.* v.2, n. 52:175-184. Jun.1992.

MINOPRIO, P.M; ITOHARA, S.; HEUSSER, C.; TONEGAWA. S.; COUTINHO, A.. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. **Immunol Rev.**; v.112, p.183-207, 1989.

MINOPRIO, P.M. COUTINHO, A; JOSKOWICZ, M; D'IMPERIO, L. M.R. EISEN, H. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. **Scand J Immunol.** v. 6, n.24: 669-679. Dec.1986.

MONCADA, S. The L-arginine: nitric oxide pathway . **Acta Physiol. Scand.**, v.145: p. 201-227, 1992.

MOODY, T.N.; OCHIENG. J.; VILLALTA, F. Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. **Febs Lett.** v. 470, p. 305-308, 2000.

MUNOZ-FERNANDEZ, M. A.; FERNANDEZ, M. A.; FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **Eur J. Immunol.**, v.22, p.301-307, 1992.

MURTA, A.C. M; PERRSECHINI, P. M; SOUTO-PADRON, T; DE SOUZA, W; GUIMARÃES, J.A; SCHARFSTEIN, J. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 43, p.27-38, 1990.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.**, v. 6, n. 12, p.3051-3064, 1992.

NEIRA, I; FERREIRA, A. T.; YOSHIDA, N. Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. **Int. J. Parasitol.**, v.32, p.405-414, 2002.



NORRIS, K.A.; BRADT, B.; COOPER, N.R.; SO, M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. **J Immunol.**; v.147: p.2240-2247, 1991.

NORRIS, K.A.; HARTH, G; SO, M. Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. **Infect Immun.** v. 57: p.2372-2377, 1989

NORRIS, K.A.; SCHRIMPF, J.E. Biochemical analysis of the membrane and soluble forms of the complement regulatory protein of *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun.** v.62, n.1, p.236-243, 1994.

OLIVEIRA, A.C.; PEIXOTO, J.R.; DE ARRUDA, L.B.; CAMPOS, MA; GAZZINELLI, R.T.; GOLENBOCK, D.T.; AKIRA, S.; PREVIATO, J.O.; MENDONCA-PREVIATO, L.; NOBREGA, A.; BELLIO, M.. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.**, v.173, n. 9, p.5688-5696, 2004.

OLIVEIRA, L.C.; BORGES, M. M.; LEAL, R.C.; ASSREURY, J.; KLOETZEL, J. K. Nitric oxide involvement in experimental *Trypanosoma cruzi* infection in *Calomys callosus* and Swiss mice. **Parasitol. Res.**, v. 83, p. 762-770, 1997.

PARHAM, P. **O Sistema Imune**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.

PÉREZ-FUENTES, R.; GUEGAN, J.F.; BARNABE, C.; LOPEZ-COLOMBO, A.; SALGADO-ROSAS, H.; TORRES-RASGADO, E.; BRIONES, B.; ROMERO-DIAZ, M.; RAMOS-JIMENEZ, J.; SANCHEZ-GUILLEN, M.C. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. **Int J Parasitol** v.3 , n.33:293-299. 2003.

PESSOA, S.B. Hospedeiros vertebrados (não humanos) do *Trypanosoma cruzi* . **Ver. Goiânia. Méd.**, v.4, n. 2, p. 83-101, 1958.

PETERSEN, C.A.; KRUMHOLZ, K.A.; BURLEIGH, B.A. Toll-Like receptor-2 regulates interleukin-1beta-dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun.**, v.73, n.10, p.6974-6980, 2005.

PETRAY, P.; ROTTENBERG, M. E.; GRINSTEIN, S.; ORN, A. Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Immunol.**, v.16, p.193–199, 1994.

PETRY, K.; VOISIN, P. J; BALTZ, T; LABOUESSE, J. Common epitopes to *Trypanosoma cruzi*, *T. dionisii*, *T. vespertilionis*, astrocytes and neurons. **J. Neuroimmunol.**, v.16, p.237, 1987.

PINSKY, D.J.; AJI, W.; SZABOLCS, M.; e cols. Nitric oxide triggers programmed cell death (apoptosis) of adult rat ventricular myocytes in culture. **Am J Physiol.**1998; (submitted)

PRATA, A. Chagas` disease. **Infect. Dis. Clin. North America**, v. 8, n. 1, p. 61-75, 1994.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease . **The Lancet Infectious Diseases** , Volume 1 , Issue 2 , Pages 92 - 100 A. 2001.

PREVIATO, J. O.; ANDRADE, A.F. B.; PESSOLANI, M. C. V.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. Aproposal for new metabolic route. **Mol. Biochem. Parasitol.** , v.16, p.58, 1985.

RAMIREZ, L E.; MACHADO, M. I.; MAYWALD, P. G.; MATOS, A.; CHIARI, E.; e LAGES SILVA, E. Primeira evidência de *Trypanosoma rangeli* no sudeste do Brasil, região endêmica para doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** vol.31, no.1, p.99-102. Jan./Feb. 1998.

RAMIREZ, M. I.; RUIZ, R. de C.; ARAYA, J. E.; DA SILVEIRA, J.F.; YOSHIDA, N.. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Infect. Immun.**, v.61, p.3636-3641, 1993.

REED, S. G.; BROWNELL, C. E.; RUSSO, D. M.; SILVA, J. S.; GRABSTEIN, K. H.; MORRISSEY, P. J..IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. of Immunol.**, v.153, p.3135–3140, 1994.

REIS, D.D.; JONES, E.M.; TOSTES, S. JR.; LOPES, E.R.; GAZZINELLI, G.; COLLEY, D.G.; MCCURLEY, T.L.Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes.**Am J Trop Med Hyg.** v.5, n. 45 :637-644. Mai. 1993.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; PIRMEZ, C.; SAVINO, W. Role of autoreactive immunological mechanisms in chagasic carditis. **Res Immunol.** v.2, n. 142 :134-137. Feb. 1991. Review.

RODRÍGUEZ A, MARTINEZ I, CHUNG A, BERLOT CH, ANDREWS NW. cAMP regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. **J Biol Chem.** 1999 Jun 11;274(24):16754-9.

ROPERT, C.; FERREIRA, L.R.; CAMPOS, M.A.; PROCOPIO, D.O.; TRAVASSOS, L.R.; FERGUSON, M.A.; REIS, L.F.; TEIXEIRA, M.M.; ALMEIDA, I.C.; GAZZINELLI, R.T. Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Microbes Infect.**, v.4, p.1015-1025, 2002.

ROTTENBERG, M.E., BAKHIET, M., OLSSON, T., KRISTENSSON, K., MAK, T., WIGZELL, H., ORN, A. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infect Immun.** v.12, n. 61 :5129-33. Dec. 1993.

ROTTENBERG, M.E.; SPORRONG, L.; PERSSON, I.; WIGZELL, H.; ORN, A. Cytokine gene expression during infection of mice lacking CD4 and/or CD8 with *Trypanosoma cruzi*. **Scand J Immunol.**; v.2, n. 41 :164-170. Feb. 1995.

RUIZ, R. C.; FAVORETO Jr., S.; DORTA, M. L.; OSHIRO, M. E. M.; FERREIRA, A. T.; MANQUE, P. M.; YOSHIDA, N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* isolates is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signalling activity. **Biochem. J.**, v. 330, p.505–511, 1998.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat. Immunol.**, v. 3, n.11, p.1041-1047, 2002.

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M. M. A.; LIMA, A. P. C. A.; MORROT, A.; JULIANO, L.; MULLER-ESTER, W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B2 receptors. **J. Exp. Med.**, v.192. p.1289–1299, 2000.

SCHAUER, R.; REUTER, G.; MÜHLPFORDT, H.; ANDRADE, A.F.B.; PEREIRA, M. E.A. The occurrence of N-acetyl- and N-glycoloylneuraminic acid in *Trypanosoma cruzi*. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem.** v. 364.p.1053-1057, 1983.

SCHENKMAN, S.; ANDREWS, N. W.; NUSSENZWEIG, V.; Robbins, E.S. *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. **Cell.**, v.55, p.157, 1988.

SCHENKMAN, S.; FERGUSON, M.A.L.; HEISE,N.; ALMEIDA, M.L.C.; MORTARA, R.; YOSHIDA, N.. Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalysed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Bioherm. Parasitol.**, v.59, p.293-304, 1993.

SCHENKMAN, S.; JIANG, M.S.; HARTH, G. W.; NUSSENZWEIG, V. A novel cell surface transialisase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 65, p.1117-1125, 1991.

SEONG, S.Y.; MATZINGER, P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. **Nat Rev Immunol.** v. 4 , n. 6 :469-478.Jun. 2004.

SCIANNI, A. Efeitos do antagonista do receptor do fator de ativação de plaquetas na infecção pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* em ratos. 2001. 74f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,2001.

SCHWENTKER, A.; BILLIAR, T. R. Inducible Nitric Oxide Synthase: From Cloning To Therapeutic Applications. **World J. Surg.**, v.26, n.7, p.772-778, 2002.

SCOTT, P.; TRINCHIERI, G. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. **Curr. Opin. Immunol.**, v.7, n.1, p.34-40, 1995.

SHARTON-KERSTEN, T.; SHER, A. Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infection. **Curr. Opin. Immunol.** v.9, p.44, 1997.

SHODA, L.K.; KEGERREIS, K.A.; SUAREZ, C.E.; RODITI, I.; CORRAL, R.S.; BERTOT, G.M.; e cols. 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 alpha, and nitric oxide. **Infect Immun**; n. 69 :2162-2171. 2001.

SILVA, G. C.; NAGIB, P. R.; CHIARI E, VAN-ROOIJEN, N.; MACHADO, C. R; CAMARGOS, E. R. Peripheral macrophage depletion reduces Central Nervous System parasitism and damage in *Trypanosoma cruzi*-Infected Suckling Rats. **J Neuroimmunol**. v. 149, p.50-58, abr. 2004.

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

SILVA, J.S.; MACHADO, F.S; MARTINS, G.A.The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease.**Front Biosci**. v.1 ; n. 8: 314-325. Mai.2003 Review.

SILVA, J. S.; VESPA, G. N.; CARDOSO, M. A.; ALIBERTI, J. C.; CUNHA, F. Q. 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.**, v.63, p.4862–4867, 1995.

SILVA, J.S; ALIBERTI, J.C; MARTINS, G.A; SOUZA. M.A; SOUTO, J.T; PADUA, M.A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz J Med Biol** . v.31, p.111-115,1998.

SOUTO-PADRÓN, T.; CAMPETELLA, O. E.; CAZZULO, J.J.; DE SOUZA, W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. **J.Cell. Sci.**, v.96, p.485-490, 1990.

STEVENSON, M.M.; TAM, M.F.; WOLF, S.F.; SHER, A. IL-12-induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism.**J. Immunol.**, v.155, n.5, p.2545-2556, 1995.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Genetic Approaches to the study of Toll-Like receptor function. **Microbes Infect**. v. 4, n.9, p.887-95, 2002.

TALVANI, A.; ROCHA, M.O.; RIBEIRO, A.L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; TEIXEIRA, M.M. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. **J Infect Dis** . v. 2, n. 189 :214-20. 2004

TARLETON, R. L. Regulation of immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. Minireview. doi:10.1016/0014-4894(91)90013-M . **Published by Elsevier Science (USA)**.1991.

TARLETON, R. L. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**. v. 15, n. 144 :7177-24. Jan. 1990.

TARLETON, R. L.; KOLLER, B. H.; LATOUR, A.; POSTAN, M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**., v. 356, p.338-340, 1992.

TARLETON, R.L.; SUN, J.; ZHANG, L.; POSTAN, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. **Infect Immun**. v. 5, n. 62 :1820-1829. Mai. 1994.

TARLETON, R.L.; GRUSBY, M.J.; POSTAN, M.; GLIMCHER, L.H. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. **Int Immunol**. v.1, n. 8 : 13-22.Jan. 1999.

TARO, K.; and SHIZUO, A. Toll-like receptor downstream signaling. **Arthritis Res Ther**. 2005.

TEIXEIRA, A.R.; NITZ, N.; GUIMARO, M.C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C.A.Chagas disease.**Postgrad Med J**. v. 82, n. 974 :788-798. Dec. 2006. Review.

TRINCHIERI, G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). **Curr Opin Immunol**. v. 1 , n. 9: 17-23.Fev. 1997. Review.

TURNER ,C.W.; LIMA, M.F.; VILLALTA ,F.. *Trypanosoma cruzi*. Uses a 45-kDa mucin for adhesion to mammalian cells. **Bioch. Bioph. Res. Commun.**, v.290, p.29-34, 2002.

UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A.; HALLAR, A.M.; STEVENS, A.; WILSON, C.B.; BASSET, M.; ADEREM, A. The *Toll-like* receptor-2 is recruited to macrophage phagosome and discriminates between pathogens. **Nature**, v. 21, n. 6755, p. 811-15, 1999.

VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; REIS, D. D.; CORREIA-OLIVEIRA, R..PCR detection of *Trypanosoma cruzi* in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. **Lancet**, p.348:891, 1996.

VANDEKERCKHOVE, F.; SCHENKMAN, S.; PONTES DE CARVALHO, L.; TOMLINSON, S.; KISO, M.; YOSHIDA, M.; HASEGAWA, A.; NUSSENZWEIG, V. Substrate specificity of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Glycobiology**, v. 2. p. 541-548, 1992

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

VILLALTA, F.; ZHANG, Y.; BIBB, K. E.; KAPPES, J. C.; LIMA, M. F. The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. **Infect Immun.**,v. 66, n.10, p.4690-4695, 1998.

VILLALTA, F.; SMITH, C.M.; RUIZ-RUANO, A.; LIMA, M.F. A ligand that *Trypanosoma cruzi* uses to bind to mammalian cells to initiate infection. **FEBS Lett.**, v.505, n.3, p.383-388, 2001.

YOSHIDA, N; BLANCO, S. A; ARAGUTH, M. F; RUSSO, M; GONZALEZ, J. The stage-specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigote of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.39, p.39, 1990.

YOSHIDA, N; MORTARA, R. A; ARAGUTH, M. F; GONZALEZ, J.C; RUSSO, M. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun.** v.57. p.1663-1667,1989.

YOSHIDA, N.; FAVORETO, Jr. S.; FERREIRA, A. T.; MANQUE, P. M.. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. **Braz. J. Med. Biol.**, v.33, p.269–278, 2000.

ZAMBRANO-VILLA, S.; ROSALES-BORJAS, D.; CARRERO, J.C.; ORTIZ-ORTIZ, L. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends Parasitol.**, v.18, n. 6, p.272-278, 2002.

ZINGALES, B.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi* interaction with host cells. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.117, p.129, 1985.

WILLE, U.; VILLEGAS, E.N.; STRIEPEN, B.; ROOS, D.S.; HUNTER, C.A. Interleukin-10 does not contribute to the pathogenesis of a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunol.** v. 6, n. 23:291-296. Jun. 2001.

WOOD, K.J.; AUSTYN, J.M. **Principles of cellular and molecular immunology.** Oxford University press Inc, New York, 1993.



**ANEXOS**

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE ESCLARECIMENTO

Você está sendo convidado a participar do estudo **Interação do *Trypanossoma cruzi* com células da resposta imune inata**. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. O objetivo deste estudo é Avaliar a resposta de neutrófilos e monócitos frente a antígenos de *Trypanossoma cruzi*. Analisar a síntese de óxido nítrico, citocinas e quimiocinas em resposta á infecção por *T. cruzi* e caso você participe, será necessário: fazer exame de sangue para sorologia para *Trypanossoma cruzi* (Doença de Chagas). Não será feito nenhum procedimento que lhe traga risco de vida, contudo você poderá ter algum desconforto quando receber uma picada para colher o sangue do seu braço.

Você poderá ter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_, li e / ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão.

Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.

Uberaba, ...../...../.....

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário ou responsável legal

\_\_\_\_\_  
Documento de identidade

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador orientador

Telefone de contato dos pesquisadores: (34) 3332-1234 e (34) 3318-5289  
(34) 3332-0939 e (34) 3318-5299

Em caso de dúvida em relação a esse documento, você pode entrar em contato com o Comitê Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), pelo telefone (34)3318-5854.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)