UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

TIAGO DA SILVA MEDINA

Participação do eixo Th17/IL-27 no controle da infecção experimental com *Trypanosoma cruzi*

Ribeirão Preto – SP

2014

TIAGO DA SILVA MEDINA

Participação do eixo Th17/IL-27 no controle da infecção experimental com *Trypanosoma cruzi*

Tese de doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
– USP para obtenção do título de doutor
em Imunologia.

Área de concentração: Imunologia Básica
e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. João Santana da
Silva

Ribeirão Preto – SP

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Medina, Tiago da Silva

Participação do eixo Th17/IL-27 no controle da infecção experimental com *Trypanosoma cruzi*. Ribeirão Preto, 2014.

144 p. : il. ; 30 cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Silva, João Santana.

1. Macrófagos produtores de Interleucina-27.
2. Linfócitos Th17.
3. Linfócitos Th1.
4. Células Tr1.
5. Miocardite.
6. *Trypanosoma cruzi*.

Nome: **Tiago da Silva Medina**

Título: Participação do eixo Th17/IL-27 no controle da infecção experimental com *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Imunologia Básica e aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof (a). Dr (a).: **João Santana da Silva** Instituição: **FMRP - USP**

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: **Silvia Beatriz Boscardin** Instituição: **ICB - USP**

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: **Karina Ramalho Bortoluci** Instituição: **UNIFESP**

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: **Ademilson Panunto Castelo** Instituição: **FFCLRP - USP**

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: **Thiago Mattar Cunha** Instituição: **FMRP - USP**

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – USP, com apoio financeiro da CAPES, CNPQ e FAPESP.

RESUMO

MEDINA, T.S. Participação do eixo Th17/IL-27 no controle da infecção experimental com *Trypanosoma cruzi*. 144 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Produzida por macrófagos e células dendríticas, a IL-27 é uma citocina heterodimérica capaz de induzir células Tr1 produtoras de IL-10 e consequentemente regular linfócitos Th1, Th2 e Th17, dependendo da doença envolvida. Partindo-se do pressuposto de que a infecção causada por *Trypanosoma cruzi* normalmente induz miocardite refletida pela migração intensa de linfócitos Th1 para o tecido cardíaco, nós analisamos o papel regulador da IL-27 nesta condição inflamatória. Nós inicialmente verificamos que a IL-27 foi prontamente induzida *in vitro* em células infectadas com *T. cruzi*. Para gerar miocardite intensa coordenada por linfócitos Th1, nós polarizamos linfócitos T naíves para o padrão Th1 na ausência de moléculas relacionadas ao perfil Th17 (camundongos IL-17R^{-/-}, IL-23^{-/-} e IL-6^{-/-}). Como esperado, a inflamação cardíaca intensa e o dano tecidual foram observados na ausência das moléculas do padrão Th17, o que contribuiu para a morte prematura dos animais IL-17R^{-/-}, IL-23^{-/-} e IL-6^{-/-}, precisa e notoriamente pela indução da migração excessiva de linfócitos Th1 para o tecido cardíaco via CXCL-9 e CXCL-10. Para explorar os mecanismos pelos quais a IL-27 controla a miocardite induzida pelo *T. cruzi*, nós encontramos um recrutamento substancial de macrófagos produtores de IL-27 para o tecido cardíaco, o qual foi mediado pelas quimiocinas CCL3 e CCL4 na ausência de moléculas do padrão Th17. Para determinar quais os receptores necessários para a produção de IL-27, nós observamos que macrófagos derivados da medula óssea de camundongos deficientes de TLR4^{-/-}, TLR9^{-/-} e NLRP3^{-/-} aboliram completamente a produção desta citocina após a infecção *in vitro* com *T. cruzi*, enquanto o receptor TLR2 foi dispensável. Nós também verificamos que macrófagos produtores de IL-27 suprimiram linfócitos Th1 através da indução de células Tr1 produtoras de IL-10 após a infecção com *T. cruzi*. Em seguida, nós avaliamos se a IL-27 foi correlacionada com a proteção cardíaca durante a doença de Chagas. Nós observamos níveis séricos elevados de IL-27 tanto em pacientes com a forma clínica indeterminada ou cardíaca leve, enquanto pacientes com cardiomiopatia moderada ou grave produziram níveis reduzidos de IL-27. Neste estudo, nós descrevemos um novo mecanismo regulador desempenhado por macrófagos produtores de IL-27 no controle da miocardite induzida por *T. cruzi*. Macrófagos produtores de IL-27 podem suprimir processos inflamatórios desencadeados por linfócitos Th1, os principais vilões na doença de Chagas.

Palavras-chave: Macrófagos produtores de Interleucina-27; Linfócitos Th17, Linfócitos Th1; Células Tr1; Miocardite; *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

MEDINA, T.S. Role of the Th17/IL-27 axis in the control of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. 144 p. PhD Thesis – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

IL-27 is a heterodimeric cytokine produced by macrophages and dendritic cells known to induce IL-10-producing Tr1 cells and to regulate Th1, Th2, and Th17 lymphocytes, depending on the underlying disease. Because the infection caused by *Trypanosoma cruzi* normally induces myocarditis mirrored by an outstanding migration of Th1 cells to the heart tissue, we analyzed the regulatory role of IL-27 in this inflammatory condition. We firstly verified that IL-27 was promptly induced by *in vitro* *T. cruzi*-infected spleen cells. To generate a robust myocarditis coordinated by Th1 lymphocytes, we polarized lymphocytes to a Th1 pattern by infecting mice in the absence of Th17-related molecules (IL-17R^{-/-}, IL-23^{-/-}, and IL-6^{-/-} mice). As expected, an impressive cardiac inflammation and damage was observed in the absence of Th17-related molecules, leading IL-17R^{-/-}, IL-23^{-/-}, and IL-6^{-/-} mice to the premature death, precisely and notably by inducing an exuberant Th1 migration to the heart tissue via CXCL9 and CXCL10 chemokines. To explore the mechanisms by which IL-27 controls *T. cruzi*-induced myocarditis, we found a striking recruitment of IL-27-producing macrophages to the heart tissue mediated by increased levels of CCL3 and CCL4 chemokines in the absence of Th17-associated molecules. To gain further insights into the receptors required to IL-27 production, we observed that bone marrow-derived macrophages from TLR4^{-/-}, TLR9^{-/-}, and NLRP3^{-/-} mice completely abolished IL-27 production after *in vitro* *T. cruzi* infection, while TLR2 was dispensable. We also verified that IL-27-producing macrophages suppressed Th1 lymphocytes by inducing IL-10-producing Tr1 cells after *T. cruzi* infection. We next assessed whether IL-27 was correlated to cardiac protection during Chagas Disease. We observed augmented serum levels of IL-27 in either patients with indeterminate (asymptomatic) form or mild cardiac form, whereas patients with moderate or severe cardiomyopathy were poor producers of IL-27. Here, we described a novel regulatory mechanism developed by IL-27-producing macrophages in the control of *T. cruzi*-induced myocarditis. IL-27-producing macrophages can suppress inflammatory processes caused by Th1 lymphocytes, the bona fide culprits of Chagas Disease.

Keywords: Interleukin-27-producing macrophages; Th17 lymphocytes; Th1 lymphocytes; Tr1 cells; Myocarditis; *Trypanosoma cruzi*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
2 OBJETIVOS	Erro! Indicador não definido.
2.1 Objetivo geral	Erro! Indicador não definido.
2.2 Objetivos específicos	Erro! Indicador não definido.
3 MATERIAL E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
3.1 Animais e grupos experimentais	Erro! Indicador não definido.
3.2 Infecção dos animais e parasitemia	Erro! Indicador não definido.
3.3 Mortalidade	Erro! Indicador não definido.
3.4 Eutanásia dos animais e coleta de amostras	Erro! Indicador não definido.
3.5 Análise histopatológica	Erro! Indicador não definido.
3.6 Análise dos níveis séricos de CK-MB	Erro! Indicador não definido.
3.7 Fenotipagem de células inflamatórias no tecido cardíaco	Erro! Indicador não definido.
3.8 PCR para quantificação de <i>T cruzi</i> no tecido cardíaco	Erro! Indicador não definido.
3.9 Cultura de macrófagos da medula óssea (BMMs)	Erro! Indicador não definido.
3.10 Avaliação da atividade microbicida	Erro! Indicador não definido.
3.11 Dosagem de óxido nítrico (NO)	Erro! Indicador não definido.
3.12 Dosagem de citocinas	Erro! Indicador não definido.
3.13 Quantificação de mRNA de citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição	Erro! Indicador não definido.
3.14 Tratamento com anti-IFN- γ e L-NMMA	Erro! Indicador não definido.
3.15 Análise estatística	Erro! Indicador não definido.
4 RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.
4.1 Estabelecimento de modelo murino com miocardite	Erro! Indicador não definido.

4.2 Caracterização fenotípica dos linfócitos no coração.....	Erro! Indicador não definido.
4.3 Linfócitos Th1 no coração controlam o parasitismo, porém induzem dano cardíaco acentuado	Erro! Indicador não definido.
4.4 A migração de macrófagos para o tecido cardíaco é acentuada na ausência de moléculas do padrão Th17.....	Erro! Indicador não definido.
4.5 Macrófagos recrutados para o coração produzem IL-27 durante a infecção com <i>T. cruzi</i>	Erro! Indicador não definido.
4.6 A miocardite causada por linfócitos Th1 é regulada por células semelhantes às Tr1	Erro! Indicador não definido.
4.7 Estressores capazes de ativar TLR4, TLR9 e NLRP3 disparam a produção de IL-27 em macrófagos	Erro! Indicador não definido.
4.8 Animais deficientes de Ebi3, uma subunidade da IL-27, são extremamente suscetíveis à infecção com <i>T. cruzi</i>	Erro! Indicador não definido.
4.9 A IL-27 inibe linfócitos Th1 no baço durante a infecção experimental com <i>T. cruzi</i>	Erro! Indicador não definido.
4.10 IL-27 não regula o número de linfócitos Th17 no coração durante a infecção com <i>T. cruzi</i>	Erro! Indicador não definido.
4.11 A IL-27 suprime linfócitos Th1 no coração e previne a miocardite induzida por <i>T. cruzi</i>	Erro! Indicador não definido.
4.12 Células Tr1 são induzidas pela IL-27 no tecido cardíaco de animais infectados com <i>T. cruzi</i>	Erro! Indicador não definido.
4.13 Bloqueio de IFN- γ e iNOS protege contra a miocardite observada nos animais deficientes de Ebi3	Erro! Indicador não definido.
4.13 Altos níveis séricos de IL-27 estão associados com formas clínicas mais brandas da doença de Chagas	Erro! Indicador não definido.
5 DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
6 CONCLUSÃO	Erro! Indicador não definido.
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Erro! Indicador não definido.

8 ANEXO	86
9 APÊNDICES	115

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou tripanossomíase, cujo agente etiológico é o parasito *Trypanosoma cruzi*, é uma das principais enfermidades causadas por protozoários na América Latina. Estima-se que a prevalência da doença seja de aproximadamente 8 milhões de indivíduos infectados nesta região, aos quais se somam cerca de 300 mil novos casos da doença a cada ano. Limitada à região latino-americana em virtude da endemicidade do vetor transmissor, a doença de Chagas restringe-se às áreas rurais, uma vez que o barbeiro – inseto vetor da doença – possui hábitos silvestres, alojando-se principalmente em palmeiras. Casas de pau a pique construídas nas proximidades de palmeiras atraem o barbeiro, facilitando a transmissão da doença para humanos. Embora a mortalidade decorrente da infecção não seja tão elevada no Brasil, a alta taxa de morbidade ainda persiste como um fator reconhecidamente preocupante para a economia regional (MONCAYO e SILVEIRA, 2009).

O ciclo de vida do *T. cruzi* possui dois hospedeiros: um vertebrado (mamífero) e um invertebrado (vetor). O ciclo da doença inicia-se após a penetração de fezes do vetor contaminadas com as formas tripomastigotas metacíclicas na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Estas formas evolutivas aderem-se à superfície celular dos macrófagos e penetram ativamente no citoplasma desta célula, onde permanecem delimitados por uma estrutura denominada de vacúolo parasitóforo. Com o intuito de destruir o parasito, lisossomos fundem-se ao vacúolo parasitóforo e liberam o seu conteúdo enzimático excessivamente ácido (TEIXEIRA *et al.*, 2012). Inicia-se, então, a ativação das enzimas NADPH oxidase e óxido nítrico sintase induzida (iNOS), cuja função é gerar espécies reativas de oxigênio necessárias para a destruição da membrana celular do parasito (DHIMAN e GARG, 2011). Imediatamente, porém, o parasito transforma-se em amastigotas, formas altamente resistentes capazes de sobreviver em ambientes inóspitos, mesmo na presença de grandes quantidades de enzimas proteolíticas e de espécies

reativas de oxigênio. Além de ser uma estrutura de resistência, os amastigotas também são formas de reprodução. Após sucessivas divisões no interior da célula, os amastigotas retornam gradualmente às formas tripomastigotas, que rompem a membrana celular após intensos movimentos no citoplasma do macrófago. No meio extracelular, os tripomastigotas tornam-se aptos para infectar novas células, mantendo o ciclo da doença no hospedeiro vertebrado (TEIXEIRA *et al.*, 2012).

A doença de Chagas distingue-se em duas fases clínicas: a aguda e a crônica. A fase aguda normalmente é inaparente, com episódios febris discretos e parasitemia elevada, porém sem desenvolvimento de sintomas clínicos específicos. Normalmente, a fase aguda torna-se aparente em crianças menores de 2 anos de idade, com episódios febris intensos, hepatoesplenomegalia e, às vezes, cardiopatia aguda, tornando-as vulneráveis à infecção ainda no estágio agudo. Quatro a oito semanas após o início da infecção, a doença torna-se latente, iniciando o período crônico. Neste período, os macrófagos infectados funcionam como disseminadores do parasito para órgãos específicos, como coração, esôfago e intestino grosso. Em 40-50% dos casos, os pacientes permanecem na forma assintomática ou indeterminada da doença, sem aparecimento de complicações cardíacas ou digestivas. Entretanto, alguns pacientes evoluem para formas mais graves da doença de Chagas, relacionadas com o aparecimento de sintomas clássicos associados aos órgãos que albergam o *T. cruzi*. Estima-se que 10% dos pacientes desenvolvam complicações digestivas, resultado da dilatação anormal do esôfago (megaesôfago) e do cólon (megacólon). Porém, a principal complicação mórbida desenvolvida durante esta fase da doença é indubitavelmente a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), que afeta 30-40% dos indivíduos infectados. A CCC é caracterizada sobretudo por intensa disfunção cardíaca, com surgimento de arritmias, espessamento do ventrículo esquerdo, cardiomegalia e insuficiência cardíaca, o que pode levar o indivíduo a óbito. Alguns indivíduos ainda

desenvolvem a forma mista, caracterizada por complicações cardíaca e digestiva (MONCAYO e ORTIZ YANINE, 2006).

A gênese da CCC tem cunho multifatorial, como proposto por diversos estudos, incluindo perda da autonomia secundária à lesão neuronal no coração, isquemia multifocal secundária à lesão microvascular, alterações estruturais causadas diretamente pela persistência do parasito no miocárdio e a indução de reação inflamatória intensa no tecido cardíaco (MARIN-NETO *et al.*, 2007).

No que tange à resposta inflamatória específica para o *T. cruzi*, os macrófagos são células indispensáveis para o controle da replicação do parasito. Quando ativadas, estas células são as principais fontes de produção de óxido nítrico (NO), um mediador inflamatório com potente atividade tripanocida (MUNOZ-FERNANDEZ *et al.*, 1992). Este perfil inflamatório é reflexo da ativação clássica dos macrófagos na presença de IFN- γ , tornando-os macrófagos M1. Esta subpopulação de macrófagos caracteriza-se pela produção eficaz de mediadores inflamatórios, como TNF, espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Após o estabelecimento do processo inflamatório, os macrófagos podem ser ativados alternativamente através da exposição a altos níveis de IL-10 e subsequentemente reprogramados para macrófagos M2 (KRAUSGRUBER *et al.*, 2011), os quais promovem reparo tecidual, aumentam a produção de IL-10 e expressam moléculas características, incluindo CD206 (CHOI *et al.*, 2010), FYZZ1 e YM1 (RAES *et al.*, 2002). Esta subpopulação, por sua vez, desempenha funções reguladoras. Há ainda indícios de que os macrófagos M2 sejam fonte essencial de produção da IL-27, uma citocina supressora (HALL *et al.*, 2012a).

Outras células fundamentais para o controle do parasito são os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, visto que há intensa proliferação de parasitos em animais geneticamente deficientes de linfócitos T, com subsequente morte prematura destes hospedeiros (RODRIGUEZ *et al.*, 1983;

SCHAUB *et al.*, 2001). É perfeitamente compreensível que linfócitos desempenhem funções importantes no controle do *T. cruzi*, já que estas células são fontes essenciais da produção de IFN- γ , a principal citocina envolvida na ativação de macrófagos (METZ *et al.*, 1993). Por outro lado, a indução de resposta inflamatória intensa, apesar de ser necessária para o controle do parasito (RODRIGUES *et al.*, 2000), está intimamente associada com o desenvolvimento de cardiomiopatia grave tanto em humanos (ABEL *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2003) quanto em modelos experimentais (SOARES *et al.*, 2001). Dessa forma, um balanço tênue na resposta inflamatória deve ser exercido para que se estabeleça um controle parasitário adequado sem que haja prejuízo da função cardíaca no hospedeiro.

Principais fontes de produção de IFN- γ , as células Th1 destacam-se como agentes importantes durante a eliminação do *T. cruzi*. Estas células geralmente induzem processo inflamatório intenso, com destruição acentuada do tecido cardíaco (SOARES *et al.*, 2001). Entretanto, a parasitemia sanguínea e o parasitismo cardíaco são normalmente controlados na presença de células Th1 (DA MATTA GUEDES *et al.*, 2010). O mecanismo de controle da replicação parasitária é exercido por macrófagos, os quais precisam do IFN- γ produzido pelas células Th1 para desenvolverem seus efeitos antiparasitários (REED, 1988).

Durante décadas, acreditava-se no caráter dual das respostas desencadeadas pelas células T CD4⁺. Esta visão particular surgiu após estudos conduzidos por Mosmann e Coffman na década de 1980, que subdividiram as células T CD4⁺ em células Th1 e células Th2, estabelecendo-se o famigerado paradigma Th1xTh2. As células Th1, cuja função principal era produzir IFN- γ , possuía caráter inflamatório, enquanto as células Th2, produtoras de IL-4 e IL-5, possuíam propriedades anti-inflamatórias (MOSMANN e COFFMAN, 1989). Ao longo do tempo, essa visão simplista tornou-se mais complexa, e novas funções foram atribuídas àquelas células. Além disso, a visão dualista descrita por Mosmann e Coffman caiu por terra em 2005

com o advento das células Th17 (HARRINGTON *et al.*, 2005). Acredita-se atualmente que células Th1, Th2 e Th17 exerçam atividades inflamatórias sob determinados aspectos, cada uma com características peculiares. Na contramão da resposta inflamatória, as células T reguladoras (Tregs) são essenciais para a manutenção do equilíbrio da resposta imune (OESTREICH e WEINMANN, 2012).

Apesar do caráter substancialmente inflamatório observado em doenças autoimunes, as células Th17 não desempenham papel deletério em doenças infecciosas. Em algumas infecções, aliás, as células Th17 são completamente dispensáveis. Na infecção com *T. cruzi*, as células Th17 estão associadas com a proteção durante a miocardite (DA MATTA GUEDES *et al.*, 2010; MIYAZAKI *et al.*, 2010). Outra evidência sugerida pelo nosso grupo de pesquisa aponta uma associação entre células Th17 e o melhor prognóstico da doença de Chagas, mostrando o papel protetor dessas células no nosso modelo de estudo (GUEDES *et al.*, 2012). As funções das células Th17 assemelham-se àquelas desenvolvidas pelas Tregs durante a doença de Chagas, ambas associadas com formas clínicas menos graves da doença (GUEDES *et al.*, 2012).

Todos os subtipos de células T CD4⁺ possuem um programa transcricional intracelular particular que pode ser ativado sob determinados estímulos. Este processo de escolha de um subtipo específico somente é possível porque as células T CD4⁺ naïves expressam de forma basal genes característicos de todos os subtipos celulares. O fator peremptório para a indução de determinado programa transcricional é o microambiente ao qual as células T CD4⁺ naïves estão expostas. Assim, células TCD4⁺ naïves são polarizadas para o subtipo Th1 na presença de IL-12, enquanto a IL-4 é a citocina necessária para a indução de células Th2. As Tregs, único subtipo anti-inflamatório, são diferenciadas na presença de somente TGF- β (WILSON *et al.*, 2009).

Assim como as outras subpopulações, as células Th17 são induzidas na presença de um microambiente particular. Sinais induzidos por TGF- β , IL-6, IL-1 β e IL-21 no interior de

linfócitos T CD4⁺ naíve promovem um programa transcricional nestas células que as polarizam para células Th17. No entanto, apenas a IL-23 contribui para a manutenção desse perfil celular (WEAVER e HATTON, 2009). Muitos estudos sugerem, entretanto, que somente a presença de TGF- β e IL-6 já é suficiente para a indução destas células (XIAO *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2009). Desta forma, a sinalização induzida pela IL-6 seria o fator preponderante que distinguiria as Tregs das células Th17 (XIAO *et al.*, 2008). Neste sentido, alguns estudos indicam que as células Th17 podem ser ainda subdivididas em dois grandes grupos: as Th17 inflamatórias – induzidas na presença de IL-6, IL-1 β e IL-21 – e as Th17 reguladoras – geradas na presença de TGF- β e IL-6 (GORESCHI *et al.*, 2010); estas últimas assumiriam características similares às Tregs (CHALMIN *et al.*, 2012).

Com propriedades anti-inflamatórias robustas, as Tregs são críticas durante o controle da resposta imune inflamatória causada pela infecção com *T. cruzi*. Estas células migram para o tecido cardíaco no momento em que a resposta inflamatória se intensifica, com o intuito de evitar eventuais danos teciduais ocasionados durante a infecção. De um modo geral, as Tregs podem suprimir processos inflamatórios de diversas maneiras, seja pela produção de mediadores solúveis, por meio do contato celular, pela captura de IL-2, pela citotoxicidade das células T efetoras ou ainda pela supressão de células apresentadoras de antígenos (VIGNALI *et al.*, 2008). Na infecção com *T. cruzi*, alguns desses mecanismos merecem destaque. É indiscutível, por exemplo, que a citocina IL-10, principal mediador solúvel produzido pelas Tregs, possui funções capazes de controlar a cardiomiopatia induzida durante a infecção experimental com *T. cruzi* (HUNTER *et al.*, 1997; ROFFE *et al.*, 2012). Outra forma de controle da inflamação cardíaca causada pelo parasito é exercida pelo contato de moléculas inibitórias presentes na superfície das Tregs com moléculas expressas na superfície de células efetoras. Este contato íntimo favorece a indução de sinais inibitórios no interior de células efetoras, os quais propiciam o controle da

resposta imune. Destacam-se neste processo as moléculas CTLA-4 (GRAEFE *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2004) e PD-1 (DULGERIAN *et al.*, 2011; GUTIERREZ *et al.*, 2011), as quais se ligam exclusivamente às moléculas CD80/CD86 e PD-L1, respectivamente.

Um capítulo recente que norteia as funções atribuídas às células T foi a descoberta da plasticidade entre os subtipos de linfócitos T CD4⁺, atribuindo-se o conceito de que um subtipo de linfócitos T CD4⁺ nada mais é do que um estado celular, o qual pode ser instável e dar origem a outro subtipo quando exposto a um determinado microambiente (BLUESTONE *et al.*, 2009). A plasticidade celular depende de mudanças intracelulares nos programas gênicos característicos de determinado subtipo. Assim, foi demonstrado que Tregs podem originar células Th17 na presença de TGF- β e IL-6; o contrário também é verdadeiro, desde que a célula Th17 perca a estimulação via IL-6 (SAKAGUCHI *et al.*, 2013). Por conta da alta instabilidade, as células Th17 também podem originar células Th1. Tal qual as Tregs e as Th17, as células Th2 também são altamente plásticas, podendo dar origem às células Th1 na presença de IL-12. Entretanto, o programa gênico induzido nas células Th1 é particularmente estável, tornando-as invariáveis mesmo na presença de microambientes propícios para a diferenciação de células Th2, Th17 e Tregs (BAUMJOHANN e ANSEL, 2013). Esta estabilidade é decorrente de mudanças epigenéticas originadas nos genes padrões das células Th1, como T-bet, STAT-1 e STAT-4, fixando-as neste perfil celular (WILSON *et al.*, 2009). Esta característica pode ser um ponto crítico para a demonstração do caráter regulador das células Th17 durante a infecção com *T. cruzi* tanto em camundongos quanto em humanos. Estas células provavelmente estão adquirindo um programa gênico semelhante ao das Tregs.

Estas observações relevam o papel central das células Th1 na indução da patogênese da doença de Chagas, uma vez que somente este subtipo celular é comprovadamente capaz de induzir danos cardíacos em modelos experimentais (SOARES *et al.*, 2001). Neste sentido, o

nosso grupo de pesquisa tenta traçar metas e estratégias capazes de conter o dano tecidual causado pelos linfócitos Th1 e por toda a resposta inflamatória advinda deste perfil celular. A busca por moléculas ou células com funções supressoras que porventura possam controlar a cardiomiopatia chagásica é o principal objetivo do nosso grupo de pesquisa.

Recentemente, uma nova molécula com propriedades anti-inflamatórias foi descrita; trata-se da citocina IL-27 (HUNTER e KASTELEIN, 2012). A sua descoberta, na verdade, data de meados da década de 1990 (PFLANZ *et al.*, 2002). Naquela época, esta citocina foi caracterizada como pró-inflamatória em virtude da sua capacidade de induzir STAT-1, T-bet e IFN- γ (CHEN *et al.*, 2000; YOSHIDA *et al.*, 2001; PFLANZ *et al.*, 2002). Somente em 2004, no entanto, as funções anti-inflamatórias desta citocina vieram à tona (VILLARINO *et al.*, 2003; ARTIS *et al.*, 2004a; ARTIS *et al.*, 2004b; VILLARINO *et al.*, 2006). Atualmente, sabe-se que esta citocina induz células semelhantes às Tr1 (do inglês *Tr1-like cells*), as quais possuem potente atividade supressora por meio da produção de níveis elevados de IL-10 (POT *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2011). Por outro lado, não é possível descartar as propriedades pró-inflamatórias da IL-27, como indução de linfócitos T citotóxicos (MAYER *et al.*, 2008) e células NK (CRABE *et al.*, 2009), além da ativação de linfócitos B (LAROUSSE *et al.*, 2006). Este padrão de resposta misto pode contribuir para a eficácia da resposta imune contra *T. cruzi*, uma vez que a IL-27 pode auxiliar tanto na prevenção da inflamação cardíaca como no controle da replicação do parasito.

A IL-27 é uma citocina heterodimérica composta pelas subunidades Ebi3 (do inglês *Epstein-Barr virus-induced gene 3*) e IL-27p28 (PFLANZ *et al.*, 2002). Únicas fontes de produção de IL-27, os macrófagos (KALLIOLIAS *et al.*, 2010) e as células dendríticas (DCs) (MASCANFRONI *et al.*, 2013) provavelmente adquirem um estágio de ativação alternativa (macrófagos M2) ou tolerogênico (DCs tolerogênicas) para induzir a produção ideal desta citocina. A IL-27 inteira (Ebi3 + IL-27p28) sinaliza via receptor de IL-27, composto pelas

cadeias IL-27R α e gp130 (PFLANZ *et al.*, 2004), o qual é expresso na superfície de DCs (MASCANFRONI *et al.*, 2013) e principalmente de linfócitos T CD4⁺ naïves (PFLANZ *et al.*, 2002). Pela ação autócrina sobre as próprias DCs, a IL-27 promove na superfície destas células a expressão da molécula CD39, uma ectonucleotidase responsável pela conversão de ATP – uma molécula inflamatória – em seus metabólitos ADP e AMP, os quais possuem função supressora. Como o ATP passa a ser convertido em seus metabólitos, este mediador inflamatório deixa de ser reconhecido pela plataforma molecular do inflamassoma NLRP3, inibindo a produção de IL-1 β e consequentemente o processo inflamatório (MASCANFRONI *et al.*, 2013). Sobre os linfócitos T CD4⁺ naïves, a IL-27 promove a sua polarização para células semelhantes às Tr1 (POT *et al.*, 2009).

Com forte poder supressor, as células semelhantes às Tr1 são consideradas Tregs induzidas. Estas células lançam mão de dois mecanismos supressores bem descritos: a produção de mediadores solúveis regulatórios (HALL *et al.*, 2012a) e a supressão por meio de contato celular via PD-1/PD-L1 (HIRAHARA *et al.*, 2012). Embora tenham capacidade de produzir IFN- γ , as células semelhantes às Tr1 agem principalmente no controle da inflamação através da produção intensa de IL-10, cujo efeito promove a supressão de células efectoras (HALL *et al.*, 2012a). Além disso, a interação da IL-27 com o seu receptor expresso na superfície de células T induz a expressão da molécula PD-L1 (HIRAHARA *et al.*, 2012).

Com o avanço do conhecimento acerca das funções da IL-27, não há dúvidas de que as células Tr1 induzidas pela IL-27 possuem amplo espectro de atuação, podendo prevenir a resposta inflamatória desencadeada por linfócitos Th1, Th2 ou Th17 (STUMHOFER e HUNTER, 2008; YOSHIDA e MIYAZAKI, 2008). Como característica marcante, os principais alvos regulados pelas células Tr1 são os linfócitos Th17, como demonstrado em diversas doenças autoimunes (FUJIMOTO *et al.*, 2011; HIRAHARA *et al.*, 2012; MASCANFRONI *et al.*, 2013;

MORAES *et al.*, 2013) ou infecciosas (YOSHIDA *et al.*, 2001; HALL *et al.*, 2012a). Desta forma, a IL-27 participa como citocina fundamental no controle da autoimunidade e em algumas doenças infecciosas. Ainda, a IL-27 exerce função supressora sobre as células Th1 em algumas doenças infecciosas (YOSHIDA *et al.*, 2001; FINDLAY *et al.*, 2010).

O fato de ser produzida especialmente por macrófagos e de possuir papel supressor no controle da imunopatogênese de diversas doenças inflamatórias faz da IL-27 um excelente alvo capaz de regular a miocardite chagásica desenvolvida pelo intenso recrutamento de linfócitos Th1 e de macrófagos M1 para o tecido cardíaco de animais infectados com *T. cruzi*. Como a IL-27 é produzida em períodos tardios das doenças inflamatórias por macrófagos M2, esta citocina pode ainda atuar no reparo do tecido cardíaco destruído pelo parasito *T. cruzi*. Neste sentido, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a importância da IL-27 na regulação da inflamação cardíaca induzida durante a infecção experimental com *T. cruzi*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a função supressora do eixo Th17/IL-27 no controle da imunopatogenia cardíaca induzida pela infecção experimental com *T. cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar se a infecção com *T. cruzi* induz a produção de IL-27 e de mediadores envolvidos com o desenvolvimento, manutenção e atividade de linfócitos Th17;
- Avaliar de que forma o linfócito Th17 agrava a miocardite chagásica;
- Determinar a fonte celular envolvida na produção de IL-27 durante a infecção com *T. cruzi*;
- Verificar se a produção de IL-27 induz células Tr1 produtoras de IL-10 na infecção com *T. cruzi*; e
- Analisar o potencial supressor das células Tr1 produtoras de IL-10 durante a infecção com *T. cruzi*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e grupos experimentais

Neste estudo, foram utilizados camundongos fêmeas WT (C57BL/6) ou deficientes de IL-17R, de IL-23, de IL-22, de IL-6, de TLR2, de TLR4, de TLR9, de NLRP3 ou de Ebi3, com idade entre 6 e 8 semanas, mantidos nos biotérios do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas exigidas pelo Comitê de Ética Animal (protocolo nº 192/2011).

3.2 Infecção dos animais e parasitemia

Os camundongos foram infectados pela via intraperitoneal (i.p.) com 1.000 formas de tripomastigotas da cepa Y diluídas em 200µL de tampão PBS 1x. Os parasitos foram mantidos por passagens seriadas em camundongos nos biotérios do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Para os experimentos *in vitro*, utilizamos tripomastigotas isolados a partir de culturas de células epiteliais de rim de macaco (LLC-MK2, ATCC-CCL7) infectadas com *T. cruzi* e mantidas a 37°C em estufa de CO₂ a 5%.

A parasitemia foi determinada em dias alternados a partir do quinto dia de infecção até o momento em que os animais controlassem a parasitemia ou morressem. Para tal, 5µl de sangue foram colhidos de um pequeno corte na cauda dos animais e colocados sobre uma lâmina, recobrimo-a com lamínula de 22 x 22 mm. A preparação foi levada ao microscópio ótico com contraste de fase, no qual a contagem do número de parasitos foi feita em 100 campos, com aumento final de 400 vezes, como previamente descrito (BRENER, 1961).

3.3 Mortalidade

A mortalidade foi avaliada diariamente através da contagem de camundongos mortos em cada grupo durante a infecção. Nestes experimentos, foram utilizados 10 animais por grupo, com período máximo de observação de 40 dias após a infecção. Os animais que sobreviveram após este período foram sacrificados. Para determinação de diferenças entre os grupos, foi utilizado o método estatístico de Kaplan-Meier.

3.4 Eutanásia dos animais e coleta de amostras

Em média, cinco animais de cada grupo foram infectados pela via intraperitoneal com 1.000 formas de tripomastigotas da cepa Y. Entre 15 e 17 dias após a infecção, os animais foram sacrificados para a coleta de sangue, baço, fígado e coração. Estes tecidos foram utilizados para análise histopatológica, bioquímica, parasitismo e dosagem de citocinas.

3.5 Análise histopatológica

Quatro a cinco animais de cada grupo foram sacrificados 15-17 dias após a infecção para a retirada dos órgãos de interesse. Amostras de tecido cardíaco e hepático foram fixadas em formol tamponado (PBS-formol a 10%) por 48 horas. Após este período, estas amostras foram desidratadas em soluções de etanol com concentrações crescentes. Os órgãos foram incluídos em blocos de parafina, e cortes de 5µm de espessura foram obtidos com o auxílio de um micrótomo. Os cortes foram dispostos em lâminas e incubados a 60°C para a fixação. Em seguida, estes foram lavados em xilol para retirar o excesso de parafina, com posterior reidratação em concentrações decrescentes de etanol. Os cortes reidratados foram lavados em água corrente e corados com hematoxilina e eosina (HE). Para a quantificação do infiltrado inflamatório do

coração e do fígado, 50 imagens de cada corte foram fotografadas usando aumento de 40x em microscópio. Em seguida, as imagens foram analisadas através da contagem do número total de núcleos, utilizando-se o programa Image J.

3.6 Análise dos níveis séricos de CK-MB

Os níveis de CK-MB, um dos principais marcadores de dano cardíaco, foram determinados no soro dos animais 15-17 dias após a infecção com 1000 formas da cepa Y de *T. cruzi*. Para a quantificação sérica dos níveis de CK-MB, foi utilizado o kit comercial CK-MB test (Labtest Ref. 118.3/1). Uma alíquota de 0.05 mL do soro ou calibrador foi incubada a 37°C por 5 minutos. A absorbância (A) foi lida por duas vezes usando o filtro de comprimento de onda de 340 nm para obter o ΔA de cada amostra. Os resultados foram expressos como atividade de CK-MB em U/mL.

3.7 Fenotipagem de células inflamatórias no tecido cardíaco

Corações dos animais foram coletados 15-17 dias após a infecção. O tecido cardíaco previamente macerado foi digerido a 37°C em RPMI incompleto contendo 0,05g/mL de liberase blendzyme CI (Roche) durante uma hora. Após a completa digestão do tecido, as células foram filtradas em cell strainer de 40 μ m para isolá-las do restante do tecido. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada utilizando o corante azul de Trypan. Para a detecção de citocinas intracelulares, as células foram plaqueadas e estimuladas com PMA [0,5 μ g/mL]/Ionomicina [5 μ g/mL] durante 6 horas; Golgi Stop foi usado para impedir a secreção proteica. Após o ajuste de 1x10⁶ células por tubo, os receptores Fc foram bloqueados com 10% de soro de coelho. Em seguida, os anticorpos de superfície combinados com diferentes fluorocromos foram adicionados às células por 30 minutos. Para a marcação intracelular, as células foram previamente fixadas e

permeabilizadas com tampão Cytotfix/Cytoperm conforme recomendação do fabricante (BD Biosciences). As células foram então lavadas e fixadas com PBS formol 1%. Células não marcadas ou com marcação simples foram utilizadas para calibrar o citômetro. As células foram adquiridas no citômetro FACSCanto II utilizando o *software* FACSDiva (BD Biosciences). As análises foram feitas no *software* FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

3.8 PCR para quantificação de *T. cruzi* no tecido cardíaco

Entre 15 e 17 dias após a infecção com 1.000 formas da cepa Y de *T. cruzi*, os corações dos animais foram removidos para quantificação do DNA total por PCR em tempo real. A extração e a quantificação do DNA do parasito por PCR em tempo real foram realizadas de acordo com Cummings & Tarleton, 2003. Brevemente, 25mg de tecido cardíaco foram digeridos com proteinase K, segundo instruções do fabricante do kit QIAamp DNA Mini Kit (250) (Qiagen). Em seguida, o PCR foi realizado usando o SYBR (Invitrogen) e o termociclador (Applied Biosystems). Os primers utilizados foram TCZ-F 5'- GCTCTTGCCCACAMGGGTGC-3' e TCZ-R 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3', os quais amplificam 195 pares de bases da sequência presente no genoma do *T. cruzi*, conhecida como DNA satélite. As amostras foram amplificadas no ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). A quantidade de parasitos no coração dos animais infectados foi estimada através de uma curva construída com DNA obtido de culturas de tripomastigotas.

3.9 Cultura de macrófagos da medula óssea (BMMs)

A extração de macrófagos da medula óssea foi previamente descrita por nosso grupo de trabalho (MARIM *et al.*, 2010). A medula óssea dos grupos dos animais em estudo foi retirada dos fêmures utilizando-se 3mL de meio RPMI incompleto. Após a homogeneização das células,

1,5mL dessa suspensão foi adicionada em placas não tratadas para a aderência das células (Optilux™, BD Biosciences) de dimensões 100 x 20mm. Um volume de 10 mL de meio RPMI 20/30 foi adicionado a essas placas. O meio 20/30 é composto de 20% de soro bovino fetal e 30% de meio condicionado de células L929 (rico em GM-CSF). Essas células foram cultivadas na presença de 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina, a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Quatro dias depois foram acrescentados mais 10 mL de meio RPMI 20/30 às placas. No sétimo dia de cultivo, as células foram removidas pela lavagem das monocamadas com PBS 1X gelado, e a concentração celular acertada de acordo com o delineamento experimental. Essas células foram cultivadas por 12 horas na presença de IFN-γ (0,1, 1 ou 10 ng/mL) e em seguida estimuladas ou não com tripomastigotas na proporção 3 parasitos para cada célula.

3.10 Avaliação da atividade microbicida

Macrófagos provenientes da medula óssea (2×10^5 células) dos animais foram adicionados em placas de 96 poços (Nunc®, Inc., Naperville, USA), em um volume final de 200 µL. Estes foram colocados para aderir e lavados com meio de cultura para a retirada de células não aderentes. Essas células foram infectadas com parasitos (3 parasitos/célula) e incubadas na presença ou não de 0,1, 1 ou 10 ng/ml de IFN-γ. Após 4 horas de infecção, as células foram lavadas para a retirada de parasitos que não entraram na célula. Depois de cinco dias de infecção, os parasitos liberados na cultura celular foram quantificados em câmara de Neubauer.

3.11 Dosagem de óxido nítrico (NO)

A dosagem de óxido nítrico foi realizada usando a reação de Griess como previamente descrito (Green, Ruiz De Luzuriaga *et al.*, 1981). A concentração de nitrito foi mensurada pela

reação colorimétrica de Griess. Resumidamente, 50 μ L de cada amostra foram adicionados a 50 μ L de reagente de Griess e incubados por 10 minutos a 26°C. Em seguida, a absorbância foi determinada em filtro de 540 nm do leitor de microplacas. Os resultados expressos em μ M foram determinados pela comparação com a curva padrão realizada com nitrito de sódio (Vetec®) em concentrações de 100 a 0,9 mM.

3.12 Dosagem de citocinas

A concentração de diversas citocinas foi mensurada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo *sandwich*, segundo as recomendações do fabricante (R&D Systems®). Placas para ELISA de alta afinidade (Corning Costar®) foram recobertas (50 μ L/poço) com anticorpo monoclonal específico para a citocina e incubadas *overnight* a 4°C. Após esse procedimento, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS 1X (pH 7,2) contendo 0,05% de Tween 20 (Sigma Chemicals®) e bloqueadas à temperatura ambiente com solução de PBS acrescido de 1% de BSA (PBS-B) por 2h. Após a lavagem das placas, as citocinas recombinantes necessárias para a confecção da curva padrão e as amostras foram adicionadas. Decorridas duas horas, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS-Tween 0,05%, e o anticorpo secundário conjugado à biotina e específico para a citocina foi adicionado na reação. Após novas lavagens, a avidina também foi adicionada aos poços. Passados 30 minutos de incubação, a revelação da reação foi realizada com a adição do substrato 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (BD Biosciences®). Após 20 minutos, a reação colorimétrica foi bloqueada com ácido sulfúrico (Merck®) 2N, e a leitura das placas foi realizada num comprimento de onda de 492 nm em leitor de microplacas (EMAX, Molecular Devices Corporation®). A concentração das citocinas de interesse foi determinada de acordo com a curva padrão obtida com as diferentes diluições da citocina recombinante. Para dosar IL-27 em amostras de indivíduos controles ou com doença de

Chagas, nós utilizamos 12 amostras de indivíduos sem doença de Chagas, 14 de pacientes assintomáticos/indeterminados, 14 com disfunção cardíaca leve, 11 com disfunção cardíaca moderada, 12 com disfunção cardíaca grave ou 11 de indivíduos isquêmicos.

3.13 Quantificação de mRNA de citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição

Para a quantificação de mRNA de citocinas, quimiocinas e de fatores de transcrição celular avaliados neste estudo, os corações e os fígados de animais infectados foram coletados e mantidos em Trizol (Life Technologies® - USA). A extração do RNA total foi realizada a partir de 25mg de tecido cardíaco utilizando-se kit de extração de RNA de acordo com as recomendações do fabricante (Promega®). Após a confecção do cDNA por meio do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems® – USA), a expressão quantitativa dos genes que codificam as citocinas, quimiocinas e os fatores de transcrição foi analisada através de reações de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema SYBR Green em um aparelho GeneAmp 7700 (Applied Biosystems® – USA). A expressão dos genes em questão foi quantificada em relação aos genes codificantes de β -actina e de GAPDH, moléculas expressas constitutivamente nas células. Estes genes foram utilizados como calibradores endógenos das reações.

Tabela 1. Sequência de iniciadores para a amplificação de mRNA de genes que codificam citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição utilizados durante a infecção experimental com *T. cruzi*. Utilizamos *GAPDH* e β -actina como calibradores endógenos das reações.

Iniciadores	Sequência dos iniciadores
<i>CXCL9</i>	Forward: AAT TTC ATC ACG CCC TTG AGC; Reverse: CAG CTG TTG TGC ATT GGA TAG C
<i>CXCL10</i>	Forward: TGA GCA GAG ATG TCT GAA TC; Reverse: TCG CAC CTC CAC ATA GCT TAC AG
<i>IFN-γ</i>	Forward: GCA TCT TGG CTT TGC AGC T; Reverse: CCT TTT TCG CCT TGC TGT TG
<i>TNF</i>	Forward: AGG GAT GAG AAG TTC CCA AAT G; Reverse: GGC TTG TCA CTC GAA TTT TGA GA
<i>Tbx21</i>	Forward: AAC CAG TAT CCT GTT CCC AGC; Reverse: CCG GAA GAT TCC ACG CCA ATT
<i>CCL3</i>	Forward: TTC TGC TGA CAA GCT CAC CCT; Reverse: ATG GCG CTG AGA AGA CTT GGT
<i>CCL4</i>	Forward: CCT GAC CAA AAG AGG CAG ACA; Reverse: AGC AAG GAC GCT TCT CAG TGA
<i>IL27</i>	Forward: GTG CCC TAC ATG CTA AAT GTC AC; Reverse: TGA TTC GCT CAG CCA CAA
<i>Foxp3</i>	Forward: AAG AAT GCC ATC CGC CA; Reverse: TCA TCT ACG GTC CAC ACT GCT C
<i>IL10</i>	Forward: CAA TAA CTG CAC CCA CTT CCC; Reverse: GAG AAA TCG ATG ACA GCG CCT
<i>GAPDH</i>	Forward: CAT CTT CTT GTG CAG TGC CA; Reverse: CGG CCA AAT CCG TTC AC
<i>B-actina</i>	Forward: CCT TCC TTC TTG GGT ATG GAA T; Reverse: TGG CAT AGA GGT CTT TAC GGA T

3.14 Tratamento com anti-IFN- γ e L-NMMA

Animais WT e deficientes de Ebi3 foram infectados com 1000 formas da cepa Y de *T. cruzi*, quantidade necessária para levar os animais deficientes de Ebi3 a óbito em cerca de duas semanas, como avaliado neste estudo. Para avaliar se a resposta inflamatória foi a causa direta da morte dos animais deficientes de Ebi3, os animais WT e deficientes de Ebi3 foram tratados com anticorpos neutralizantes de IFN- γ ou com L-NMMA, inibidor não seletivo de todas as isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Para que o tratamento interferisse o mínimo possível na parasitemia dos animais, nós o iniciamos no momento em que a parasitemia começa a declinar

(9º dia de infecção) e prosseguimos o tratamento no 12º e 15º dias após a infecção. A concentração inicial de α -IFN- γ foi de 200 μ g/mL no 9º dia, com concentrações posteriores de 100 e 50 μ g/mL nos dias 12 e 15 d.p.i., respectivamente. Por outro lado, o tratamento com L-NMMA foi feito com 100 μ g/mL nos dias 9, 12 e 15 d.p.i.

3.15 Análise estatística

A escolha dos testes estatísticos dos experimentos descritos acima foi inicialmente baseada na normalidade das amostras. Como normalmente os experimentos com animais são desenhados utilizando-se duas amostras pareadas, contendo uma variável e cujos resultados são gerados por meio de dados numéricos (e não categóricos ou ordenativos), empregamos o Teste t e o teste ANOVA para a comparação entre dois grupos e entre vários grupos, respectivamente. Em experimentos analisados através do teste t, utilizamos o teste de Mann-Whitney como pós-teste. Em experimentos analisados através do teste ANOVA, utilizamos o teste de Tukey como pós-teste. Para os experimentos com amostras humanas, utilizamos o teste ANOVA (um critério), já que partimos de várias amostras independentes, contendo uma variável e utilizando-se dados numéricos. Atribuímos diferença estatística entre os grupos quando o valor de “p” foi inferior a 0,05 ($p < 0,05$). Os gráficos foram confeccionados no programa GraphPad Prism 5.

4 RESULTADOS

4.1 Estabelecimento de modelo murino com miocardite

A resposta intensa do padrão Th1 é responsável pela indução de miocardite grave causada pela infecção com *T. cruzi* em modelos murinos, isto porque ela auxilia a ativação de macrófagos via IFN- γ , os quais destroem o parasito, porém causam dano cardíaco (SOARES *et al.*, 2001). Ainda, linfócitos Th17 podem ser reprogramados para linfócitos Th1 sob determinados estímulos (WILSON *et al.*, 2009). Partindo-se destas premissas, nós estabelecemos um modelo experimental caracterizado por intenso infiltrado de linfócitos Th1 no coração de camundongos infectados pela via intraperitoneal com 1000 formas da cepa Y de *T. cruzi* na ausência de moléculas essenciais para a geração, manutenção ou resposta de linfócitos Th17, como o receptor de IL-17 (IL-17R), a IL-23 e a IL-6.

Inicialmente, nós caracterizamos a importância dessas moléculas na proteção da inflamação cardíaca mediada pelas células Th1 durante a infecção experimental com *T. cruzi*. Verificamos que os animais deficientes de IL-17R, IL-23 ou IL-6 foram extremamente suscetíveis à infecção quando comparados com camundongos WT, os quais são resistentes a esta quantidade de parasitos (Figura 1A). Os camundongos IL-17R^{-/-}, IL-23^{-/-} e IL-6^{-/-} sucumbiram à infecção entre os dias 18 e 25 após a infecção, enquanto os camundongos WT permaneceram vivos até o término do experimento - 40º dia após a infecção (Figura 1A). Ressalta-se ainda que animais IL-22^{-/-} comportaram-se de forma similar aos camundongos WT, sugerindo que esta citocina é dispensável durante a infecção com *T. cruzi*, o que, aliás, é completamente compreensível, uma vez que esta citocina está intimamente associada à inflamação de mucosas, e não a processos sistêmicos ou cardíacos, como os induzidos pelo *T. cruzi*.

Figura 1. Moléculas do padrão Th17 são necessárias para a resistência do hospedeiro durante a infecção experimental com *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 e deficientes das moléculas IL-17R, IL-23, IL-22 ou IL-6 foram infectados pela via intraperitoneal com 1000 formas da cepa Y de *T. cruzi*. **(A)** A sobrevida dos animais foi avaliada diariamente até o 40º dia de infecção. **(B)** A parasitemia foi quantificada em dias alternados, com início no 5º e término no 15º dia após a infecção, contando-se 100 campos da lâmina confeccionada a partir de 5 µL de sangue obtidos através de um ligeiro corte na cauda dos animais. Os dados mostrados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. *P < 0,05 após utilização do teste estatístico de Kaplan-Meier.

Após a análise da parasitemia desses animais, verificamos que camundongos deficientes de moléculas do padrão Th17 não controlaram adequadamente os parasitos na corrente sanguínea ao longo do tempo quando comparados com o grupo controle (Figura 1B). A quantidade de parasitos na corrente sanguínea manteve-se controlada no quinto dia em todos os grupos, com leve aumento no sétimo dia nos animais WT e deficientes de IL-17R, IL-23 ou IL-22 (Figura 1B). No pico da infecção, foram detectados cerca de 4000 tripomastigotas/µL de sangue nos camundongos deficientes de IL-17R e IL-23, enquanto metade desta quantidade (aproximadamente 2000 tripomastigotas/µL de sangue) foi detectada nos animais WT e naqueles deficientes de IL-22 ou IL-6; mesmo contendo quantidades de parasitos significativamente menores que os animais deficientes de IL-17R e IL-23 no nono dia, os animais IL-6^{-/-} têm um aumento substancial no número de parasitos na corrente sanguínea ainda no sétimo dia (Figura

1B), indicando que a ausência de moléculas do padrão Th17 prejudica a resposta inflamatória sistêmica.

Quando avaliamos a resposta inflamatória sistêmica no baço desses animais 17 dias após a infecção com *T. cruzi*, verificamos que o número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ totais estava diminuído nos camundongos IL-23^{-/-} e IL-6^{-/-} quando comparado com os animais controles (Figuras 2A e B). Nós encontramos aproximadamente 1x10⁶ linfócitos T CD4⁺ nos baços dos animais WT, número significativamente maior do que os 4x10⁵ linfócitos T CD4⁺ presentes nos baços dos animais deficientes de IL-23^{-/-} e IL-6^{-/-} (Figura 2A). Ao avaliarmos a função desses linfócitos, verificamos uma redução do número de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ e de produtores de IL-17 nos animais deficientes de IL-17R^{-/-}, IL-23^{-/-} e IL-6^{-/-} quando comparados com os animais WT (Figura 2C). Da mesma maneira, verificamos uma diminuição significativa na quantidade de linfócitos T CD8⁺ totais nos animais deficientes de IL-23 e IL-6 em relação aos animais controles (Figura 2B), o que refletiu em menor número de linfócitos T CD8⁺ multifuncionais produtores de IFN- γ , IL-17 e em processo de desgranulação (linfócito T CD8⁺CD107a⁺IFN- γ ⁺IL-17⁺) nos animais com deficiência de moléculas da resposta Th17 quando comparados com o grupo controle (Figura 2D). Assim, a redução no número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ totais refletiu em menor número de linfócitos funcionais no baço dos animais deficientes de moléculas do padrão Th17. Essa diminuição da resposta inflamatória sistêmica observada na ausência de moléculas do padrão Th17 provavelmente impediu o controle adequado dos parasitos na corrente sanguínea, como verificado anteriormente (Figura 1B).

Figura 2. Animais deficientes de moléculas do padrão Th17 possuem resposta inflamatória sistêmica acentuada durante a infecção experimental com *T. cruzi*. Dezesete dias após a infecção dos camundongos C57BL/6 e deficientes das moléculas IL-17R, IL-23 ou IL-6 com 1000 formas da cepa Y de *T. cruzi*, o número de células T CD4⁺ (A), T CD8⁺ (B), T CD4⁺IFN-γ⁺ (C), T CD4⁺IL-17⁺ (D) e T CD8⁺ IFN-γ⁺IL-17⁺CD107a⁺ (E) foi quantificado no baço desses animais por citometria de fluxo. Os dados mostrados representam a média ± SD de dois experimentos independentes. *P < 0,05 após a utilização do teste ANOVA (um critério) empregando-se o teste de Tukey como pós-teste.

Em virtude do aumento da suscetibilidade dos animais na ausência de moléculas do padrão Th17 durante a infecção com *T. cruzi*, nós avaliamos se os órgãos alvos do parasito – fígado e coração – estavam comprometidos nos camundongos IL-17R^{-/-}, IL-23^{-/-} e IL-6^{-/-} decorridos 17 dias do início da infecção. Cortes histológicos dos animais deficientes de moléculas do padrão Th17 mostram integridade do fígado semelhante àquela observada nos animais WT (Figura 3A), sem indícios de processo inflamatório aparente e, portanto, sem dano hepático detectável, avaliado aqui pela detecção sérica das enzimas AST e ALT (Figura 3B). Níveis séricos ligeiramente superiores a 150U/mL de AST foram detectados em todos os grupos analisados, os quais são semelhantes aos detectados no soro de animais WT naïves (levemente inferiores a 150U/mL). Quanto à detecção sérica de ALT, os níveis desta outra enzima indicativa

de dano hepático foram próximos de 10 U/mL em todos os grupos, os quais também foram semelhantes aos detectados nos animais WT naïves. Também não houve diferença na produção de mediadores inflamatórios - TNF, IL-12 e IFN- γ – no fígado destes animais 17 dias após a infecção (Figura 3C).

Figura 3. A estrutura hepática e a resposta inflamatória no fígado mantêm-se preservadas e inalteradas nos animais deficientes de moléculas do padrão Th17 durante a infecção experimental com *T. cruzi*. (A) O infiltrado inflamatório no fígado foi avaliado em cortes histológicos dos animais C57BL/6 e deficientes das moléculas IL-17R, IL-23 ou IL-6 decorridos 17 dias do início da infecção com 1000 formas da cepa Y de *T. cruzi*. (B) O dano hepático foi mensurado pela detecção sérica das enzimas ALT e AST. (C) A detecção das citocinas inflamatórias TNF, IL-12 e IFN- γ foi feita a partir do homogenato do fígado previamente embebido em inibidor de proteases. Os dados mostrados representam a média $\pm$ SD de dois (B e C) ou três (A) experimentos independentes. *P < 0,05 após a utilização do teste ANOVA (um critério) empregando-se o teste de Tukey como pós-teste.

Por outro lado, observamos intenso infiltrado inflamatório no coração de animais deficientes de moléculas do padrão Th17 comparado com o observado nos camundongos

controles após 17 dias do início da infecção, como observado nas imagens representativas de cortes histológicos do coração (Figura 4A). Ao quantificarmos o número de células no tecido cardíaco, verificamos que o processo inflamatório foi significativamente maior nos animais deficientes de moléculas do padrão Th17 em comparação com o grupo controle neste período da infecção (Figura 4B). Contamos em média 650 núcleos de células presentes no coração dos animais deficientes de moléculas do padrão Th17, número que foi significativamente elevado em relação aos cerca de 450 núcleos de células contados nos grupos controles (Figura 4B). Para confirmarmos esses dados, também quantificamos a área nuclear nos cortes histológicos dos corações desses animais, uma medida indireta da inflamação cardíaca. Assim, verificamos um aumento da área nuclear nos animais deficientes de moléculas do padrão Th17 em relação aos animais controles decorridos 17 dias da infecção (Figura 4C). O infiltrado inflamatório notorizou-se pela migração de células morfológicamente semelhantes a linfócitos (Figura 4A), o que nos instigou a caracterizá-los de acordo com o seu perfil fenotípico.

Figura 4. Moléculas do padrão Th17 controlam a inflamação cardíaca durante a infecção experimental com *T. cruzi*. (A) O infiltrado inflamatório no coração dos animais C57BL/6 e deficientes das moléculas IL-17R, IL-23 ou IL-6 foi avaliado em cortes histológicos decorridos 17 dias do início da infecção com 1000 formas da cepa Y de *T. cruzi*. O infiltrado inflamatório (B) e a porcentagem de área nuclear (C) foram quantificados em 50 imagens de cortes histológicos do coração de animais C57BL/6 e deficientes das moléculas IL-17R, IL-23 ou IL-6 através do programa Image J. Os dados mostrados representam a média $\pm$ SD de dois (B e C) ou três (A) experimentos independentes. * $P < 0,05$ após a utilização do teste ANOVA (um critério) empregando-se o teste de Tukey como pós-teste.

4.2 Caracterização fenotípica dos linfócitos no coração

Como verificamos um aumento no número de células morfológicamente semelhantes a linfócitos no coração dos animais deficientes de moléculas do padrão Th17 após a infecção com *T. cruzi*, nós caracterizamos fenotipicamente a subpopulação de linfócitos envolvida na indução de miocardite nestes animais. Indícios sugerem que linfócitos Th1 são gerados na ausência de um microambiente favorável para Th17 (WILSON *et al.*, 2009), conduzindo-nos à hipótese de que a ausência de moléculas do padrão Th17 favoreceria a indução de linfócitos Th1. Como esperado,

verificamos uma expressão acentuada de mRNA de quimiocinas que favorecem a migração de linfócitos Th1, tais como CXCL9 (Figura 5A) e CXCL10 (Figura 5B), no coração de animais deficientes de moléculas do padrão Th17 comparados com animais WT após 17 dias do início da infecção. Observamos ainda intensa migração de linfócitos Th1 para o tecido cardíaco na ausência destas moléculas neste período da infecção. Da mesma forma, detectamos ainda níveis aumentados de mediadores inflamatórios e fator de transcrição típicos do padrão Th1, como IFN- γ , IL-12, TNF e T-bet, na ausência de moléculas do padrão Th17, quando comparados com os animais WT (Figura 5D), sem que houvesse diferença nas moléculas do padrão Th2, como IL-4 e GATA-3, nestes grupos (dados não mostrados). Estes resultados mostram uma clara intensificação da resposta Th1 na ausência de moléculas relacionadas ao padrão Th17, o que pode ter contribuído para a indução de miocardite grave e morte do hospedeiro.

Figura 5. A migração de linfócitos Th1 para o tecido cardíaco via CXCL9 e CXCL10 é intensificada na ausência de moléculas do padrão Th17 durante a infecção com *T. cruzi*. A quantificação relativa do mRNA que codifica CXCL9 (A) e CXCL10 (B) foi realizada por PCR em tempo real a partir de tecido cardíaco após 17 dias do início da infecção. (C) Células T CD4⁺IFN-γ⁺ foram quantificadas no tecido cardíaco dos animais 17 dias após a infecção por citometria de fluxo. (D) A expressão de mRNA de TNF, IFN-γ e T-bet foi quantificada conforme em A e B, enquanto a quantificação das proteínas TNF, IL-12 e IFN-γ foi determinada por ELISA. Os dados mostrados representam a média ± SD de dois experimentos

independentes. * $P < 0,05$ após a utilização do teste ANOVA (um critério) empregando-se o teste de Tukey como pós-teste.

4.3 Linfócitos Th1 no coração controlam o parasitismo, porém induzem dano cardíaco acentuado

A inflamação causada por linfócitos Th1 possui atividade tripanocida protetora durante a infecção com *T. cruzi* (RODRIGUES *et al.*, 2000), porém a exacerbação dessa resposta normalmente possui efeitos deletérios para o hospedeiro, com indução de dano cardíaco acentuado (DA MATTA GUEDES *et al.*, 2010). Essas observações nos encorajaram a avaliar o dano e o parasitismo cardíacos na ausência de moléculas do padrão Th17 durante a infecção experimental com *T. cruzi*. Notoriamente, os resultados obtidos confirmaram nossas expectativas; os animais deficientes de moléculas do padrão Th17 foram mais eficientes no controle do parasitismo cardíaco em comparação com os animais WT (Figura 6A), porém o dano cardíaco, avaliado pela quantificação sérica de creatina quinase-MB (CK-MB), foi intenso nos animais IL-27R^{-/-}, IL-23^{-/-} e IL-6^{-/-} quando comparado com o do grupo controle após 17 dias de infecção com *T. cruzi* (Figura 6B). Numericamente, detectamos aproximadamente 15pg de DNA do parasito por miligrama de tecido cardíaco nos animais controles, quantidade significativamente maior àquela detectada em animais deficientes de moléculas do padrão Th17, os quais contiveram 3-4 vezes menos DNA do parasito por miligrama de tecido (Figura 6A). Em relação aos níveis de CK-MB, detectamos cerca de 1000 U/L desta quinase cardíaca nos soros dos animais controles, enquanto níveis acima de 1500 U/L foram detectados no soro de animais deficientes de moléculas do padrão Th17 (Figura 6B).

Figura 6. Moléculas do padrão Th17 previnem o dano cardíaco e dificultam a eliminação dos parasitos alojados no coração. (A) O parasitismo cardíaco foi quantificado por PCR em tempo real a partir de fragmentos de tecido cardíaco dos animais C57BL/6 e deficientes de IL-17R, IL-23 ou IL-6 após 17 dias do início da infecção com *T. cruzi*, utilizando-se concentrações conhecidas de *T. cruzi* obtido em cultura de células para estabelecer uma curva-padrão. (B) O dano cardíaco foi avaliado pela detecção sérica da isoenzima CK-MB nos animais relatados anteriormente após 17 dias de infecção. Os dados mostrados representam a média $\pm$ SD de um (A) ou dois (B) experimentos independentes. *P < 0,05 após a utilização do teste ANOVA (um critério) empregando-se o teste de Tukey como pós-teste.

4.4 A migração de macrófagos para o tecido cardíaco é acentuada na ausência de moléculas do padrão Th17

O IFN- γ produzido pelos linfócitos Th1 é necessário para a ativação de macrófagos, os quais eliminam o parasito através da produção de NO (RODRIGUES *et al.*, 2000). Como foi verificado um aumento no número de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ no 17º dia após a infecção com *T. cruzi*, nós examinamos se a produção de IFN- γ relacionou-se com o maior recrutamento de macrófagos para o tecido cardíaco. Dezesete dias após a infecção com *T. cruzi*, houve expressão aumentada do mRNA de quimiocinas envolvidas com a migração de macrófagos, como CCL3 e CCL4, nos animais deficientes de moléculas do padrão Th17 quando comparados com os animais WT (Figuras 7A e B), sugerindo que o IFN- γ , de alguma forma,

promova o recrutamento de macrófagos. Houve um aumento de aproximadamente 3 vezes na expressão de CCL3 e de 2 vezes na expressão de CCL4 em animais com deficiência de moléculas do padrão Th17 em relação aos animais WT.

Figura 7. A expressão de mRNA de quimiocinas envolvidas com o recrutamento de macrófagos está aumentada na ausência de moléculas do padrão Th17 durante a infecção com *T. cruzi*. A expressão relativa de mRNA de CCL3 (A) e CCL4 (B) foi quantificada por meio de PCR em tempo real a partir de fragmentos de tecido cardíaco dos animais C57BL/6 e deficientes de IL-17R, IL-23 ou IL-6 após 17 dias do início da infecção com *T. cruzi*. Os dados mostrados representam a média $\pm$ SD de dois experimentos independentes. *P < 0,05 após a utilização do teste ANOVA (um critério) empregando-se o teste de Tukey como pós-teste.

Como a presença de IFN- γ e IL-12 no microambiente favorece a polarização para macrófagos M1 (HEUSINKVELD *et al.*, 2011), nós caracterizamos o perfil fenotípico dos macrófagos que migraram para o coração 17 dias após a infecção dos animais com *T. cruzi*. Neste período da infecção, tanto a expressão de iNOS (Figura 8A) como a do seu mRNA (Figura 8B) estavam significativamente aumentadas na ausência de moléculas do padrão Th17 quando comparadas com a de animais WT. Ainda, a produção de NO, avaliada indiretamente pela produção de nitrito no sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados com *T. cruzi* e IFN- γ , foi significativamente maior na ausência de moléculas do padrão Th17 do que em animais

controles após 48 horas de estímulo (Figura 8C). BMDM dos animais IL-17R^{-/-}, IL-23^{-/-} e IL-6^{-/-} produziram quantidades significativamente maiores de nitrito do que os BMDM provenientes dos animais WT após estímulo *in vitro* com *T. cruzi* e IFN- γ em todas as concentrações utilizadas ([0,1], [1] ou [10ng/mL]) (Figura 8C). Esses dados sugerem que, na ausência de moléculas do padrão Th17, há aumento no número de macrófagos que atuam na produção de mediadores inflamatórios necessários para a eliminação do parasito do tecido cardíaco.

Figura 8. Moléculas do padrão Th17 controlam a expressão de iNOS e a consequente produção de NO durante a infecção experimental com *T. cruzi*. A expressão de iNOS (A) e do seu mRNA (B) foi quantificada 17 dias após a infecção por imunohistoquímica e por PCR em tempo real, respectivamente. (C) A produção de nitrito foi avaliada pelo método de Griess após a estimulação de BMDM com *T. cruzi* e IFN- γ em diferentes concentrações ([0,1; 1 e 10 ng/mL]) durante 48 horas. Os dados mostrados representam a média $\pm$ SD de dois experimentos independentes. *P < 0,05 após a utilização do teste ANOVA (um critério) empregando-se o teste de Tukey como pós-teste.

4.5 Macrófagos recrutados para o coração produzem IL-27 em períodos tardios da infecção com

T. cruzi

A IL-27 é uma citocina heterodimérica envolvida na supressão de respostas inflamatórias (HUNTER e KASTELEIN, 2012). Esta peculiaridade despertou nosso interesse em avaliar o papel desta citocina no controle da inflamação cardíaca durante a infecção experimental com *T. cruzi*. Inicialmente, avaliamos se a estimulação *in vitro* com *T. cruzi* promove o aumento na produção de IL-27 por células totais do baço. De fato, quando estimuladas com o parasito, as células do baço aumentam significativamente a expressão de mRNA e a produção de IL-27 em relação às não estimuladas (Figuras 9A e B). Após 48 horas em cultura, células totais do baço produziram aproximadamente 200 pg/mL de IL-27 na ausência de estímulos, porém esta produção atingiu níveis superiores a 1000 pg/mL na presença do parasito (Figura 9A). Quando avaliamos a expressão relativa da IL-27, observamos um aumento de 4 vezes na produção do mRNA desta citocina (Figura 9B), indicando que a estimulação com *T. cruzi* promove a produção de IL-27 por células totais do baço.

Para explorar a possível participação da IL-27 no controle da miocardite causada por *T. cruzi* no período tardio da infecção, nós analisamos a produção desta citocina no tecido cardíaco 17 dias após a infecção. Corroborando nossa hipótese, nós verificamos aumento da produção de IL-27 no tecido cardíaco de animais deficientes de moléculas do perfil Th17 em relação aos animais controles (Figura 9C). A produção de IL-27 no coração de animais WT infectados com *T. cruzi* foi de aproximadamente 100pg/100mg de tecido cardíaco, enquanto que esta produção foi superior a 250pg/100mg de tecido na ausência de moléculas do padrão Th17 após 17 dias de infecção (Figura 9C).

Figura 9. O parasito *T. cruzi* induz IL-27 no período tardio da infecção para controlar a inflamação cardíaca demasiada. (A) A produção de IL-27 foi quantificada no sobrenadante de cultura de células do baço de animais C57BL/6 após estimulação *in vitro* com *T. cruzi* (MOI 3:1) durante 48 horas. (B) A expressão de mRNA de IL-27 foi quantificada a partir da coleta de células do baço após 7 horas de cultivo e estímulo *in vitro* como em descrito em A. (C) A produção de IL-27 no tecido cardíaco dos animais C57BL/6 e deficientes de IL-17R, IL-23 ou IL-6 foi avaliada por ELISA após 17 dias do início da infecção com *T. cruzi*. Os dados mostrados representam a média $\pm$ SD de dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ após a utilização do teste t empregando-se o teste de Mann-Whitney como pós-teste (A e B) e após a utilização do teste ANOVA (um critério) empregando-se o teste de Tukey como pós-teste (C).

Como macrófagos e células dendríticas estão associadas com a produção de IL-27 (KALLIOLIAS *et al.*, 2010; MASCANFRONI *et al.*, 2013), nós determinamos a fonte de produção desta citocina no coração de animais infectados com *T. cruzi*. Células dendríticas não foram boas produtoras de IL-27 no coração de animais infectados. Sob estímulo com *T. cruzi* em cultura celular, as células dendríticas de todos os grupos analisados produziram aproximadamente 100 pg/mL de IL-27 (Figura 10A), uma quantidade provavelmente sem efeito biológico expressivo. Com adição de LPS na cultura, um forte ativador de células dendríticas, a produção de IL-27 não ultrapassou 200 pg/mL em todos os grupos (Figura 10A). Na ausência de estímulo, as células dendríticas de todos os grupos foram incapazes de produzir tal citocina (Figura 10A). Além disso, o número de células dendríticas produtoras de IL-27 após estímulo com *T. cruzi* foi

extremamente pequeno, com média de 40 células em todos os grupos analisados (Figura 10B). Mesmo após a adição de LPS e *T. cruzi* na cultura, o número de células dendríticas produtoras de IL-27 permaneceu inalterado, o que sugere que estas células participam discretamente da produção de IL-27 durante a infecção experimental com *T. cruzi*. Por outro lado, macrófagos não apenas produziram altos níveis de IL-27 após a estimulação com *T. cruzi* (aproximadamente 1000 pg/mL em todos os grupos analisados) ou com o re-estímulo com IFN- γ (aproximadamente 1500 pg/mL) (Figura 10C), como estavam significativamente aumentados nos corações de animais deficientes de moléculas relacionadas ao padrão Th17 em comparação com os animais controles. Apenas 5% das células que expressaram CD11b foram capazes de produzir IL-27 no coração de animais WT, porcentagem duas vezes menor em relação àquelas observadas nos animais deficientes de moléculas do padrão Th17 (Figura 10D). Embora tenha havido intensa produção de mediadores inflamatórios por macrófagos no tecido cardíaco na ausência de moléculas do padrão Th17 (Figura 8), este perfil inflamatório é paulatinamente modificado no período tardio da infecção, já que estes macrófagos aumentam a produção de IL-27 no coração dos animais decorridos 17 dias de infecção (Figura 9D), o que não é observado no início da infecção (10º dia) (dado não mostrado). Esses dados indicam que macrófagos produtores de IL-27 estão em maior número no tecido cardíaco de animais deficientes de moléculas do padrão Th17, com a finalidade de conter o intenso processo inflamatório gerado no coração desses animais, o que nos permitiu elucidar acerca do provável papel anti-inflamatório desta citocina na contenção da inflamação cardíaca mediada por linfócitos Th1.

Figura 10. Macrófagos são as principais células produtoras de IL-27 durante estímulo *in vitro* com *T. cruzi*. (A) O sobrenadante da cultura de células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos WT foi coletado para a dosagem de IL-27 após estímulo *in vitro* com *T. cruzi* (MOI 3:1) e com LPS durante 18 horas. (B) O número de células CD11c⁺IL-27⁺ presentes no coração dos animais WT e deficientes de IL-17R, IL-23 e IL-6 foi quantificada após 17 dias de infecção por citometria de fluxo. (C) A dosagem de IL-27 foi feita a partir do sobrenadante de cultura de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos WT estimulados *in vitro* com *T. cruzi* (MOI 3:1) e com IFN- γ [10ng/mL] durante 24 horas. (D) O número de células CD11b⁺IL-27⁺ no coração dos animais WT e deficientes de IL-17R, IL-23 ou IL-6 foi determinado por citometria de fluxo 17 dias após a infecção. Os dados mostrados representam a média $\pm$ SD de dois experimentos independentes. *P < 0,05 após a utilização do teste ANOVA (um critério) empregando-se o teste de Tukey como pós-teste.

4.6 A miocardite causada por linfócitos Th1 é regulada por células semelhantes às Tr1

Mecanismos supressores de resposta imune são ativados nos períodos tardios da infecção com *T. cruzi* para evitar dano cardíaco no hospedeiro (HUNTER *et al.*, 1997; DE ARAUJO *et al.*, 2012; TOSELLO BOARI *et al.*, 2012). Avaliamos, portanto, a cinética de indução de Tregs

durante a infecção experimental com *T. cruzi* por meio da utilização de animais C57BL/6 expressando a proteína GFP sob o controle da região promotora de Foxp3. Verificamos aumento significativo de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ tanto no timo quanto no baço destes animais 21 dias após a infecção em relação aos períodos iniciais da infecção (Figura 11A), apesar de não ter havido aumento significativo tanto no linfonodo drenante do coração (mediastino) quanto num linfonodo não relacionado (inguinal) (Figura 11A). Também avaliamos a produção da principal citocina anti-inflamatória envolvida no controle da miocardite chagásica: a IL-10 (HUNTER *et al.*, 1997). Como esperado, a produção de IL-10 (Figura 11B) e a expressão do seu mRNA (Figura 11c) estavam elevadas no tecido cardíaco dos animais IL-27R^{-/-}, IL-23^{-/-} e IL-6^{-/-} em comparação com os animais controles decorridos 17 dias da infecção. Inesperadamente, o número de Tregs convencionais (Figura 11D) e a expressão de Foxp3 (Figura 11E) no coração dos animais deficientes de moléculas do padrão Th17 não estavam aumentados em comparação com os animais do grupo controle, indicando que outras células eram as fontes primárias da produção de IL-10. Visto que a IL-27 é responsável pela indução de células semelhantes às Tr1 produtoras de IL-10 (POT *et al.*, 2009), nós quantificamos estas células no tecido cardíaco dos animais infectados com *T. cruzi*. Dezesete dias após a infecção, nós observamos um número maior de células T CD4⁺Foxp3⁻ produtoras de IL-10 no coração dos animais deficientes de moléculas relacionadas ao padrão Th17 do que em animais controles (Figura 11F), sugerindo um papel importante da IL-27 na indução das células semelhantes às Tr1 durante a infecção experimental com *T. cruzi*.

Figura 11. A regulação da resposta inflamatória observada na ausência de moléculas do padrão Th17 é controlada por células semelhantes às Tr1. (A) A cinética de indução de Tregs clássicas foi determinada pela infecção de animais WT Foxp3-GFP⁺ com 1000 formas da cepa Y de *T. cruzi*. Baço, timo, linfonodo mediastino e linfonodo inguinal foram coletados e analisados quanto à presença de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ por citometria de fluxo. A produção de IL-10 (B), a expressão do mRNA desta citocina (C) e a expressão do mRNA de Foxp3 (E) foram avaliadas no tecido cardíaco de animais WT e deficientes de IL-17R, IL-23 ou IL-6 decorridos 17 dias do início da infecção com *T. cruzi*. (D e F) A quantificação de células T CD4⁺Foxp3⁺IL-10⁺ e T CD4⁺Foxp3⁺IL-10⁺ no coração foi feita por citometria de fluxo 17 dias após a infecção dos animais. Os dados mostrados representam a média $\pm$ SD de um (A), dois (B, D e F) ou três (C e E) experimentos independentes. *P < 0,05 após a utilização do teste ANOVA (um critério) empregando-se o teste de Tukey como pós-teste.

4.7 Estressores capazes de ativar TLR4, TLR9 e NLRP3 disparam a produção de IL-27 em macrófagos

Diversos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) expressos na membrana ou no citoplasma de macrófagos atuam como sensores capazes de reconhecer moléculas provenientes do *T. cruzi* ou do dano celular causado por este patógeno, como TLR2 (CAMPOS *et al.*, 2001),

TLR4 (OLIVEIRA *et al.*, 2004), TLR9 (BAFICA *et al.*, 2006) e NLRP3 (GONCALVES *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013). Assim, nós avaliamos se estes receptores expressos em macrófagos eram essenciais para a produção adequada de IL-27 após estimulação *in vitro* com *T. cruzi*. Camundongos WT estimulados com *T. cruzi* ou com *T. cruzi* + IFN- γ produziram níveis adequados de IL-27 (Figura 12). O estímulo somente com *T. cruzi* induziu uma produção de aproximadamente 2000 pg/mL de IL-27 (Figura 12). Na ausência do reconhecimento do parasito pelos receptores TLR4, TLR9 e NLRP3, a produção desta citocina foi ínfima (Figura 12). Na ausência da sinalização via TLR4 e NLRP3, a produção de IL-27 caiu para níveis inferiores a 50pg/mL, considerado abaixo da produção basal, já que macrófagos WT não estimulados produziram níveis maiores (cerca de 200 pg/mL). A sinalização via receptor TLR9 também é crítica para a produção de IL-27, visto que macrófagos deficientes de TLR9 estimulados com *T. cruzi* produziram níveis similares aos obtidos por macrófagos WT não estimulados. Com a adição de IFN- γ na cultura celular, citocina necessária para ativar os macrófagos, a produção de IL-27 por macrófagos WT aumentou para aproximadamente 2800 pg/mL (Figura 12). Entretanto, o cenário de produção de IL-27 permaneceu a níveis basais na ausência de TLR4, TLR9 e NLRP3 (Figura 12), mostrando a importância destes três PRRs para o reconhecimento parasitário e consequente produção de IL-27. O TLR2 não está envolvido com a indução da produção de IL-27 por macrófagos, visto que a produção desta citocina manteve-se similar entre os grupos WT e deficientes de TLR2 tanto na presença de *T. cruzi* como na presença de *T. cruzi* + IFN- γ (Figura 12).

Figura 12. O reconhecimento do *T. cruzi* pelos receptores TLR4, TLR9 e NLRP3 expressos em macrófagos é imprescindível para a produção de IL-27. Macrófagos derivados da medula óssea de animais WT e deficientes de TLR2, TLR4, TLR9 e NLRP3 foram estimulados *in vitro* com *T. cruzi* (MOI 3:1) e com IFN-γ [10ng/mL] durante 24 horas. O sobrenadante da cultura foi coletado para a dosagem de IL-27 por ELISA. Os dados mostrados representam a média ± SD de um único experimento. *P < 0,05 após a utilização do teste ANOVA (um critério) empregando-se o teste de Tukey como pós-teste.

4.8 Animais deficientes de Ebi3, uma subunidade da IL-27, são extremamente suscetíveis à infecção com *T. cruzi*

Para confirmar a importância da IL-27 na regulação da inflamação gerada pela infecção experimental com *T. cruzi*, nós avaliamos a sobrevivência dos animais deficientes de Ebi3, uma subunidade que compõe a IL-27. Ratificando os dados anteriores, os animais deficientes de Ebi3 foram extremamente suscetíveis à infecção com *T. cruzi* quando comparados com animais WT. Os animais deficientes de Ebi3 sucumbiram à infecção entre os dias 15 e 16 após a inoculação intraperitoneal de 1000 formas da cepa Y de *T. cruzi*, enquanto os animais controles permaneceram vivos até o 40º dia (Figura 13A). Também foi possível verificar uma diferença clara na parasitemia sanguínea entre os animais WT e deficientes de Ebi3. Enquanto os animais deficientes de Ebi3 controlaram mais eficientemente a parasitemia, atingindo um pico de aproximadamente 500 tripomastigotas por microlitro de sangue no nono dia de infecção, os

animais WT tiveram uma parasitemia significativamente acentuada neste período, com média de 1500 tripomastigotas por microlitro de sangue (Figura 13B).

Figura 13. IL-27 confere resistência ao hospedeiro durante a infecção experimental com *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 e deficientes de Ebi3 foram infectados pela via intraperitoneal com 1000 formas da cepa Y de *T. cruzi*. **(A)** A sobrevivência dos animais foi avaliada diariamente até o 40º dia de infecção. **(B)** A parasitemia foi quantificada em dias alternados, com início no 5º e término no 13º dia após a infecção, contando-se 100 campos da lâmina em microscópio ótico. Os dados mostrados foram obtidos a partir de um único experimento. * $P < 0,05$ após utilização do teste estatístico de Kaplan-Meier.

4.9 A IL-27 inibe linfócitos Th1 no baço durante a infecção experimental com *T. cruzi*

Como a IL-27 inibe linfócitos Th1 e Th17 em processos inflamatórios diversos (HOLSCHER *et al.*, 2005; ANDERSON *et al.*, 2009; FINDLAY *et al.*, 2010; HIRAHARA *et al.*, 2012), avaliamos se a IL-27 tem poder supressor sobre linfócitos Th17 analisando inicialmente respostas sistêmicas. Observamos que camundongos WT e deficientes de IL-27 tiveram quantidades similares de linfócitos T CD4⁺IL-17⁺ e de T CD4⁺RORγT⁺IL-17⁺ no baço após 15 dias do início da infecção com *T. cruzi*. Cerca de 4% dos linfócitos T CD4⁺ produziram IL-17 no baço dos animais WT e deficientes de IL-27 após estímulo ou não com PMA/Ionomicina (Figura 14A). Ainda, aproximadamente 30% dos linfócitos T CD4⁺RORγT⁺ produziram IL-17 no baço desses animais após estímulo ou não com PMA/Ionomicina (Figura 14B), indicando que a IL-27 não suprime a resposta Th17 sistêmica na infecção com *T. cruzi*. Quando avaliamos a resposta

Th1 sistêmica, nós verificamos o aumento vertiginoso no número de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ no baço dos animais deficientes de IL-27 em comparação com animais controles decorridos 15 dias da infecção. Apesar de não ter havido diferença significativa no número de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ na ausência de estímulo com PMA/Ionomicina, nós observamos um aumento de aproximadamente 7 vezes no número dessas células no baço dos animais deficientes de IL-27 em relação aos animais controles após a estimulação com PMA/Ionomicina (Figura 14C), reforçando nossa hipótese de que a IL-27 regula negativamente a proliferação de linfócitos Th1 na infecção experimental com *T. cruzi*. O gráfico representativo mostra a diferença abismal no número de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ entre os grupos WT e deficientes de IL-27 após a estimulação com PMA/Ionomicina (Figura 14C). Para confirmar a nossa hipótese, nós quantificamos a produção de IFN- γ , IL-10 e IL-17 no baço e no soro dos animais WT e deficientes de Ebi3. Quinze dias após a infecção, nós verificamos que animais deficientes de Ebi3 produziram níveis significativamente elevados de IFN- γ tanto no baço quanto no soro em comparação com os animais controles, enquanto os níveis de IL-10 e IL-17 foram similares entre os grupos no baço (Figura 14D), porém não detectados no soro (dados não mostrados).

Figura 14. IL-27 é um mediador anti-inflamatório necessário para o controle de linfócitos Th1 no baço de animais infectados com *T. cruzi*. Células do baço foram estimuladas ou não em cultura com PMA/Ionomomicina + Golgi Stop durante 6 horas. A quantificação de células T CD4⁺ produtoras de IL-17 (A), de células T CD4⁺RORγT⁺ produtoras de IL-17 (B) e de células T CD4⁺ produtoras de IFN-γ (C) no baço de animais WT ou deficientes de Ebi3 após 17 dias do início da infecção com 1000 formas de *T. cruzi* foi feita por citometria de fluxo. (D) Dot plot representativo do número de células T CD4⁺ produtoras de IFN-γ no baço dos animais WT ou deficientes de Ebi3. (E) A produção de IFN-γ, IL-10 e IL-17 foi quantificada em homogenatos do baço de animais WT e deficientes de Ebi3 após 15 dias de infecção. Os dados mostrados foram obtidos a partir de dois (A, B e E) ou três (C e D) experimentos independentes. *P < 0,05 após utilização do teste t, empregando-se o teste de Mann-Whitney como pós-teste.

4.10 IL-27 não regula o número de linfócitos Th17 no coração durante a infecção com *T. cruzi*

Além de suprimir linfócitos Th1, a IL-27 também regula negativamente a indução de linfócitos Th17 em diversos modelos de inflamação (BATTEN *et al.*, 2006; ANDERSON *et al.*, 2009; POT *et al.*, 2011), principalmente em doenças autoimunes (FUJIMOTO *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2013). Como estávamos trabalhando com animais deficientes de moléculas do padrão Th17, não foi possível determinar até o momento se a IL-27 regula o número de linfócitos Th17 no tecido cardíaco durante a infecção com *T. cruzi*. Porém, a aquisição de animais deficientes de Ebi3 nos possibilitou tal análise. Verificamos, assim, que o número de linfócitos Th17 no coração foi similar entre os animais WT e deficientes de Ebi3 após 15 dias do início da infecção. Tanto na presença como na ausência do estímulo *in vitro* com PMA/Ionomicina, o número de células T CD4⁺RORγT⁺, de T CD4⁺IL-17⁺ ou de T CD4⁺RORγT⁺IL-17⁺ no coração permaneceu similar entre os grupos (Figuras 15 A, B e C). Os animais WT e deficientes de IL-27 tiveram aproximadamente 25% de linfócitos T CD4⁺RORγT⁺ (Figura 15A) e 7% de células T CD4⁺IL-17⁺ (Figura 15B) na ausência ou presença do estímulo com PMA/Ionomicina. Aproximadamente 13% dos linfócitos T CD4⁺ expressaram RORγT e produziram IL-17 no coração de animais WT e Ebi3^{-/-} após 15 dias do início da infecção com *T. cruzi* (Figura 15C). Para consolidar esses dados, nós quantificamos a produção de IL-17 no coração de animais WT e deficientes de Ebi3 após 15 dias de infecção. Os níveis de produção de IL-17 no tecido cardíaco foram novamente similares entre os grupos (Figura 15D), indicando que a IL-27 não atua na regulação de linfócitos Th17 no coração de animais infectados com *T. cruzi*.

Figura 15. IL-27 não tem efeito biológico sobre linfócitos Th17 durante a infecção experimental com *T. cruzi*. Células do infiltrado inflamatório cardíaco foram estimuladas ou não em cultura com PMA/Ionomica + Golgi Stop durante 6 horas. A quantificação de células T CD4⁺ROR γ T⁺ (A), de células T CD4⁺ produtoras de IL-17 (B) e de células T CD4⁺ROR γ T⁺ produtoras de IL-17 (C) no coração de animais WT ou deficientes de Ebi3 após a infecção com 1000 formas de *T. cruzi* foi feita por citometria de fluxo. (D) A produção de IL-17 foi quantificada em homogenatos do coração de animais WT e deficientes de Ebi3 após 15 dias de infecção. Os dados mostrados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes. *P < 0,05 após utilização do teste t, empregando-se o teste de Mann-Whitney como pós-teste.

4.11 A IL-27 suprime linfócitos Th1 no coração e previne a miocardite induzida por *T. cruzi*

Como a IL-27 age na supressão de processos inflamatórios causados por linfócitos T efetores (HALL *et al.*, 2012b; GWYER FINDLAY *et al.*, 2013), nós avaliamos se a inflamação cardíaca é regulada negativamente pela IL-27 durante a infecção experimental com *T. cruzi*. Presumivelmente, nós verificamos intenso processo inflamatório no coração dos animais deficientes de Ebi3 em relação aos animais controles após 15 dias do início da infecção (Figura 16A). A quantificação do DNA do parasito no coração sustenta a hipótese de que os animais deficientes de Ebi3 possuem menor parasitismo cardíaco do que os animais WT após 15 dias da infecção (Figura 16B), o que é perfeitamente aceitável, visto que os animais deficientes de Ebi3 possuem maior inflamação cardíaca do que os animais do grupo controle. Ainda, a resposta inflamatória acentuada na ausência de IL-27 refletiu em maior dano cardíaco nesses animais em

comparação com os animais WT, como observado pela quantificação dos níveis séricos de CK-MB (Figura 16C). Os níveis desta isoenzima ultrapassaram 1000 U/L no soro dos animais deficientes de IL-27, enquanto que estes níveis atingiram quantidades similares a 500 U/L no soro dos animais controles (Figura 16C), sugerindo que a IL-27 desempenha função protetora necessária para conter o dano cardíaco induzido pelo *T. cruzi*.

Figura 16. A IL-27 previne o dano cardíaco causado pelo intenso infiltrado de células Th1 no coração durante a infecção com *T. cruzi*. (A) O infiltrado inflamatório, (B) o parasitismo cardíaco e (C) o dano cardíaco dos animais C57BL/6 e deficientes de Ebi3 foram avaliados após 15 dias do início da infecção com 1000 formas da cepa Y de *T. cruzi* por meio de cortes histológicos, da quantificação de DNA do parasito e dos níveis séricos de CK-MB, respectivamente. Os dados mostrados representam a

média $\pm$ SD de dois experimentos. * $P < 0,05$ após a utilização do teste t, empregando-se o teste de Mann-Whitney como pós-teste.

Alvo central do nosso estudo, nós determinamos se a IL-27 atua sobre os linfócitos Th1, suprimindo-os. Neste sentido, nós quantificamos o número de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ presentes no coração dos animais WT e deficientes de Ebi3. Corroborando novamente nossos dados prévios, nós observamos um aumento de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ no coração dos animais deficientes de Ebi3 em relação aos animais controles após 15 dias do início da infecção. Apesar de não ter existido diferença estatística no número de linfócitos T CD4⁺ totais nos corações dos grupos analisados (Figura 17A), verificamos que, em média, somente 13% da população de células T CD4⁺ eram produtoras de IFN- γ nos animais WT infectados após estímulo com PMA/Ionomicina, uma quantidade significativamente menor do que aquela verificada nos animais deficientes de Ebi3, cuja proporção atingiu média de 24% de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ sob o mesmo estímulo (Figura 17B), determinando o papel crucial da IL-27 no controle da miocardite induzida por linfócitos Th1. Nota-se ainda que a quantidade de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ presentes no tecido cardíaco é similar entre os grupos na ausência do estímulo com PMA/Ionomicina; o *dot plot* representativo mostra a clara diferença na produção de IFN- γ no coração dos animais WT e deficientes de Ebi3 (Figura 17C). Para ratificar o efeito supressor da IL-27 sobre a produção de IFN- γ na infecção com *T. cruzi*, nós quantificamos a produção tanto de IL-2, uma citocina necessária para a manutenção de células Th1 e consequente produção de IFN- γ , quanto do próprio IFN- γ na ausência de Ebi3. Como esperado, a produção de IL-2 (Figura 17D) e de IFN- γ (Figura 17E) estava significativamente aumentada no tecido cardíaco dos animais deficientes de Ebi3 quando comparada com a dos animais WT.

Figura 17. IL-27 controla eficientemente linfócitos Th1 no tecido cardíaco de animais infectados com *T. cruzi*. Células do infiltrado inflamatório cardíaco foram estimuladas ou não em cultura com PMA/Ionomomicina + Golgi Stop durante 6 horas. A quantificação de células T CD4⁺ totais (A) ou de células T CD4⁺ produtoras de IFN-γ (B) no coração de animais WT ou deficientes de Ebi3 após a infecção com 1000 formas de *T. cruzi* foi feita por citometria de fluxo. (C) A produção de IFN-γ e IL-2 foi quantificada em homogenatos do coração de animais WT e deficientes de Ebi3 após 15 dias de infecção. Os dados mostrados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. *P < 0,05 após utilização do teste t, empregando-se o teste de Mann-Whitney como pós-teste.

4.12 Células Tr1 são induzidas pela IL-27 no tecido cardíaco de animais infectados com *T. cruzi*

O principal efeito modulador da IL-27 ocorre por meio da indução de células semelhantes às Tr1 (APETOHO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011). Para confirmar a participação da IL-27 na indução de células semelhantes às Tr1 na infecção com *T. cruzi*, nós quantificamos estas células no coração dos animais WT e deficientes de Ebi3. Como esperado, um número

significativamente aumentado de células T $CD4^+Foxp3^-IL-10^+$ estava presente no coração de animais WT em comparação com os animais deficientes de *Ebi3* após o 15º dia de infecção, sem que houvesse diferença no número de Tregs clássicas. Na presença ou não de estímulo com PMA/Ionomomicina em cultura de células do coração, aproximadamente 12% das células T $CD4^+Foxp3^-$ produziram IL-10 nos animais controles, enquanto que apenas 5% dessas células produziram IL-10 nos animais deficientes de IL-27 (Figura 18A). Por outro lado, houve redução do número de Tregs clássicas nos animais deficientes de IL-27 em relação aos animais controles, porém a diferença não foi significativa (Figura 18B), o que ratifica o papel regulador da IL-27 apenas sobre a população semelhante às Tr1, caracterizadas aqui como células T $CD4^+Foxp3^-IL-10^+$. Conjuntamente, esses dados revelam o papel central dos linfócitos Th1 no controle do parasitismo cardíaco, porém a intensificação desta resposta culmina com a indução de dano cardíaco, o que resulta na morte prematura dos hospedeiros. A IL-27 emerge, portanto, como novo mediador anti-inflamatório capaz de induzir células Tr1 produtoras de IL-10 e prevenir a miocardite causada por linfócitos Th1 na infecção com *T. cruzi*.

Figura 18. IL-27 induz Tregs semelhantes às Tr1 no tecido cardíaco de animais infectados com *T. cruzi*. Células do infiltrado inflamatório cardíaco foram estimuladas ou não em cultura com PMA/Ionomomicina + Golgi Stop durante 6 horas. A quantificação de células T $CD4^+Foxp3^-$ produtoras de IL-10 (A) e de células T $CD4^+Foxp3^-$ produtoras de IL-10 (B) no coração de animais WT ou deficientes de

Ebi3 após a infecção com 1000 formas de *T. cruzi* foi feita por citometria de fluxo. Os dados mostrados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. *P < 0,05 após utilização do teste t, empregando-se o teste de Mann-Whitney como pós-teste.

4.13 Bloqueio de IFN- γ protege contra a miocardite observada nos animais deficientes de Ebi3

Animais deficientes de Ebi3 tiveram intensa indução de células Th1 e de produção de IFN- γ no tecido cardíaco após a infecção com *T. cruzi* (Figura 17). O controle da resposta Th1 por meio do bloqueio *in vivo* de IFN- γ poderia, portanto, reverter o intenso processo de miocardite observado nos animais deficientes de Ebi3. Entretanto, para que não houvesse proliferação excessiva do parasito, iniciamos o tratamento no pico da parasitemia, já que o número de parasitos no sangue é reduzido significativamente nos dias subsequentes. Assim, animais WT e deficientes de Ebi3 foram infectados com 1000 formas da cepa Y e tratados ou não com α -IFN- γ nos dias 9, 12 e 15 após a infecção. Os animais deficientes de Ebi3 tratados com veículo sucumbiram rapidamente à infecção (entre 15 e 16 d.p.i.), porém aqueles tratados com α -IFN- γ foram significativamente mais resistentes ao *T. cruzi* (p=0,0014), sucumbindo à infecção somente entre os dias 25 e 26 p.i. (Figura 19A). O tratamento de animais WT com α -IFN- γ não prejudicou a sobrevivência desses animais (Figura 19A). Além disso, o tratamento com α -IFN- γ não prejudicou o controle do parasitismo tanto nos animais WT como nos deficientes de Ebi3 (Figura 19B).

Figura 19. O bloqueio de IFN- γ protege parcialmente os animais deficientes de Ebi3 durante a infecção experimental com *T. cruzi* sem prejudicar o controle da parasitemia. Animais C57BL/6 e deficientes de Ebi3 foram infectados com 1000 formas da cepa Y de *T. cruzi* e posteriormente tratados com α -IFN- γ pela via intraperitoneal após 9, 12 e 15 dias do início da infecção. A sobrevivência (A) e a parasitemia (B) dos animais tratados com α -IFN- γ foram avaliadas como descrito na Figura 13. Os dados mostrados foram obtidos a partir de dois (A, B) experimentos independentes. * $P < 0,05$ após utilização do teste estatístico de Kaplan-Meier.

4.13 Altos níveis séricos de IL-27 estão associados com formas clínicas mais brandas da doença de Chagas

Nossos dados sugerem que a IL-27 possui propriedades anti-inflamatórias capazes de abrandar a miocardite desenvolvida durante a infecção experimental com *T. cruzi*. Esta proposição nos conduziu à avaliação dos níveis séricos de IL-27 em pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas, estratificando-os de acordo com o grau de comprometimento do tecido cardíaco observado, a saber: pacientes sem comprometimento cardíaco – forma indeterminada –, pacientes com a forma cardíaca leve, com a cardíaca moderada, com a cardíaca grave ou com a isquêmica. Fortalecendo nossa hipótese, nós verificamos intensa produção de IL-27 nos pacientes com a forma indeterminada e com a cardíaca leve quando comparada com a detectada no soro de pacientes com as formas moderada, grave ou isquêmica (Figura 20). Pacientes com a forma indeterminada produziram níveis

superiores a 35.000 pg/mL de IL-27 sérica, enquanto que pacientes com a forma cardíaca leve produziram níveis séricos próximos de 30.000 pg/mL desta citocina (Figura 20). Uma redução significativa foi observada nos outros grupos analisados; em média, os pacientes com a forma moderada e isquêmica produziram metade (cerca de 15.000 pg/mL) da quantidade observada no soro dos pacientes com a forma leve, enquanto que os níveis séricos foram menores ainda nos pacientes com a forma grave da doença (aproximadamente 10.000 pg/mL) (Figura 20), sugerindo que a IL-27 tem função protetora capaz de prevenir o dano cardíaco em pacientes com doença de Chagas.

Figura 20. Níveis séricos elevados de IL-27 estão associados com formas clínicas brandas em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica. A IL-27 foi dosada no soro de indivíduos controles e de pacientes assintomáticos/indeterminados ou com disfunção cardíaca leve, moderada, grave ou isquêmica. Os dados mostrados representam a média $\pm$ SD de um único experimento. * $P < 0,05$ após a utilização do teste ANOVA (um critério) empregando-se o teste de Tukey como pós-teste.

5 DISCUSSÃO

A miocardite causada durante a infecção com *T. cruzi* é indubitavelmente a principal complicação desenvolvida durante a doença de Chagas (MARIN-NETO *et al.*, 2007). Frequentemente associada com a indução de uma resposta Th1, a inflamação cardíaca é necessária para o controle do parasito ((RODRIGUES *et al.*, 2000), porém a exacerbação desta resposta compromete as funções do coração, gerando arritmia, cardiomegalia e insuficiência cardíaca (MARIN-NETO *et al.*, 2007; DA MATTA GUEDES *et al.*, 2010). As células Th1 são, portanto, consideradas as maiores vilãs envolvidas na geração da miocardite chagásica (SOARES *et al.*, 2001). Para prevenir ou amenizar o desenvolvimento da forma cardíaca grave nos pacientes com doença de Chagas, esforços hercúleos são feitos habitualmente para tentar descobrir novos alvos terapêuticos com funções imunomodulatórias envolvidas na supressão da miocardite chagásica.

Diferentemente do que acontece em diversas doenças autoimunes, nosso grupo e outros sugerem que as células Th17 possuem atividade anti-inflamatória na doença de Chagas (DA MATTA GUEDES *et al.*, 2010; GUEDES *et al.*, 2012; MAGALHAES *et al.*, 2013). Além disso, a plasticidade das células T trouxe à tona possíveis fenômenos outrora inconcebíveis, como a reprogramação de células Th17 em Th1 (BAUMJOHANN e ANSEL, 2013). Fundamentando-se nessas proposições, nós lançamos a hipótese de que seria possível gerar um modelo animal com miocardite grave causada pela intensa migração de linfócitos Th1 para o coração de animais deficientes de moléculas do padrão Th17. Confirmando nossas expectativas, a miocardite grave foi perfeitamente induzida por intenso infiltrado inflamatório de linfócitos Th1 na ausência do microambiente adequado para a polarização de linfócitos Th17. Portanto, a sinalização que polariza para linfócitos Th17 previne a indução de linfócitos Th1 durante a infecção experimental com *T. cruzi*, provavelmente inativando o programa gênico relacionado com a expressão de

fatores de transcrição como T-bet, STAT1 e STAT4, além de mediadores inflamatórios, como o IFN- γ (BAUMJOHANN e ANSEL, 2013), o que reitera o perfil regulador das células Th17 na doença de Chagas.

A isoenzima MB da creatina quinase (CK-MB) é expressa tipicamente no tecido cardíaco em situações de homeostase (ALVAREZ LORENZO *et al.*, 1999). Perturbações geradas no coração, disparadas em casos como infarto agudo do miocárdio ou miocardite chagásica, aumentam a concentração sérica desta isoenzima, a qual é utilizada rotineiramente como marcador bioquímico de dano cardíaco (DAWIE *et al.*, 2011). No modelo de miocardite causada por linfócitos Th1, a resposta inflamatória no coração foi responsável pelo aumento sérico de CK-MB na ausência de moléculas do padrão Th17, indicando que os linfócitos Th17 previnem a destruição cardíaca. A falência cardíaca causada pela inflamação local foi o motivo da morte prematura dos hospedeiros. Em compensação, nossos resultados mostram que a intensificação da resposta Th1 controlou eficientemente o parasitismo cardíaco, o que sugere que deve existir um balanço tênue entre a resposta inflamatória e a anti-inflamatória para que haja controle concomitante do parasito e da inflamação. Nesse sentido, a busca de mediadores anti-inflamatórios capazes de contrabalançar a miocardite chagásica é indiscutivelmente o maior desafio enfrentado pelo nosso grupo de pesquisa. A utilização do modelo de miocardite conduzida pela intensa migração de linfócitos Th1 nos possibilitou avaliar células e moléculas com capacidade de suprimir esta resposta. Amparando-se neste modelo, nossos resultados propõem um novo mecanismo regulatório disparado pela IL-27 capaz de regular a resposta inflamatória gerada na presença do parasito.

A capacidade de produzir IL-27 após a estimulação *in vitro* de células do baço com *T. cruzi* foi fator determinante para postularmos o possível envolvimento desta citocina no controle da miocardite durante a infecção experimental com *T. cruzi*. Esta citocina é produzida

necessariamente por duas fontes celulares: as células dendríticas (MASCANFRONI *et al.*, 2013) e os macrófagos (KALLIOLIAS *et al.*, 2010). Células dendríticas diferenciadas *in vitro* não foram boas produtoras de IL-27 durante a estimulação *in vitro* com *T. cruzi*, mesmo após o estímulo concomitante com LPS (um ativador eficiente das DCs), descartando o possível papel dessas células na síntese e secreção de IL-27 durante a infecção experimental com *T. cruzi*. Os níveis de IL-27 produzidos pelas células dendríticas após o estímulo com *T. cruzi* provavelmente não exercem atividade biológica satisfatória e suficiente para regular processos inflamatórios, como a miocardite chagásica. Macrófagos, todavia, foram excelentes produtores de IL-27 após estimulação com o parasito tanto *in vitro* como *in vivo*. Não há dúvidas de que os níveis de IL-27 produzidos por macrófagos na infecção com *T. cruzi* exerçam atividade anti-inflamatória suficiente a ponto de modular a inflamação cardíaca.

A IL-27 tem função reguladora sobre os linfócitos Th1, Th17 e Th2, reprimindo os fatores de transcrição ROR γ T e GATA-3 (HUNTER e KASTELEIN, 2012). Mesmo ativando T-bet, a IL-27 também suprime respostas inflamatórias do tipo Th1 por mecanismos ainda obscuros (FINDLAY *et al.*, 2010). Essas evidências nos encorajaram a avaliar a possível influência da IL-27 na supressão destas subpopulações linfocitárias durante a infecção com *T. cruzi*. Apesar do papel central de linfócitos Th17 como uma subpopulação anti-inflamatória na doença de Chagas, os nossos dados não demonstram qualquer influência da IL-27 no controle da resposta Th17, como observado em outras doenças parasitárias (ANDERSON *et al.*, 2009; HALL *et al.*, 2012a) ou autoimunes (HIRAHARA *et al.*, 2012). Em contrapartida, linfócitos Th1 foram fortemente controlados pela ação de macrófagos produtores de IL-27 na infecção com *T. cruzi*, dando sustentáculo à hipótese de que esta citocina exerce funções reguladoras capazes de prevenir a miocardite chagásica. Nossa hipótese foi consolidada a partir de observações relacionando a presença da IL-27 com a diminuição drástica no número de células T produtoras de IFN- γ tanto

no baço (regulação sistêmica) como no coração (regulação local) de animais infectados. Certamente, a exacerbação da resposta Th1 refletiu em melhor controle do parasitismo cardíaco, apesar de ter sido deletério para o hospedeiro, o que confirma a necessidade do equilíbrio da resposta inflamatória na infecção com *T. cruzi*, uma vez que níveis reduzidos de IFN- γ favorecem o crescimento do parasito (METZ *et al.*, 1993), enquanto níveis elevados causam dano cardíaco grave (ABEL *et al.*, 2001).

Mesmo exercendo atividade inflamatória em diversas doenças autoimunes (AMADI-OBÍ *et al.*, 2007; HIROTA *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2011), as células Th17 assumem características anti-inflamatórias na doença de Chagas (GUEDES *et al.*, 2012; MAGALHAES *et al.*, 2013). O TGF- β é o mediador central na indução deste padrão funcional dicotômico. A exposição de células T naíves a altos níveis de TGF- β e IL-6 polarizam-nas para células Th17 reguladoras, induzindo a expressão das ectonucleotidases CD39 e CD73 na sua superfície, o que culmina com a geração e secreção de adenosina, um mediador anti-inflamatório; já a presença de IL-6, IL-1 β e IL-23 no microambiente induz a polarização de células T naíves para o perfil Th17 inflamatório, com alta capacidade de produção de IFN- γ e IL-17A (CHALMIN *et al.*, 2012). Talvez esse perfil regulador observado na doença de Chagas seja controlado exclusivamente pela exposição a altas concentrações de TGF- β , enquanto que esta exposição seja menor em doenças autoimunes desencadeadas pelos linfócitos Th17. Portanto, é completamente aceitável o fato de que a IL-27 não regule a produção de IL-17 por linfócitos Th17 durante a infecção experimental com *T. cruzi*, visto que a IL-27 é comprometida com a regulação de perfis inflamatórios.

Embora haja aumento da expressão de T-bet, CXCR3 e STAT-1 – moléculas do padrão Th1 – após a exposição à IL-27, as células T naíves transformam-se em células semelhantes às Tr1 e adquirem perfil regulador caracterizado pela produção elevada de IL-10 (POT *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011). A regulação da resposta inflamatória pela ação do eixo IL-27/células Tr1

foi mostrada tanto em doenças parasitárias como em doenças autoimunes (ANDERSON *et al.*, 2009; POT *et al.*, 2009). Nossos dados sugerem que a IL-27 é essencial para a indução das células Tr1 também na infecção com *T. cruzi*, ratificando o papel da IL-27 como molécula reguladora necessária para a indução de uma subpopulação de linfócitos T com alta capacidade supressora. No nosso modelo proposto, a inflamação cardíaca é modulada na presença de macrófagos produtores de IL-27 no coração, citocina indispensável para a geração de células semelhantes às Tr1, cuja principal função é secretar altos níveis da citocina IL-10, a qual tem ação anti-inflamatória eficaz.

A IL-10 é certamente o mediador anti-inflamatório com maior potencial de supressão de células Th1 atualmente descrito para a doença de Chagas (HUNTER *et al.*, 1997; ABEL *et al.*, 2001). Secretada preferencialmente por células T reguladoras naturais (nTregs) e induzidas (iTregs), a IL-10 pode controlar também a resposta de macrófagos M1, convertendo-os a um perfil alternativamente ativado denominado de M2 (LIU *et al.*, 2013). Ao produzirem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, os macrófagos M1 tornam-se células efectoras com alta atividade tripanocida (VESPA *et al.*, 1994). À medida que exercem seus efeitos sobre o parasito, os macrófagos M1 podem promover intenso dano tecidual, principalmente no coração (CHANDRASEKAR *et al.*, 2000; CHANDRA *et al.*, 2002). Para que haja controle da resposta inflamatória, as nTregs e as iTregs são recrutadas para o local da infecção/lesão (DE ARAUJO *et al.*, 2012). Estas células reguladoras promovem a polarização dos macrófagos para o perfil M2 ao expô-los à citocina IL-10 (LIU *et al.*, 2013). Os macrófagos M2, por sua vez, atuam para manter a homeostasia local, promovendo o reparo e a fibrose teciduais (GHARIB *et al.*, 2013). Nossos resultados indicam que macrófagos M1 são recrutados para o tecido cardíaco de animais infectados com *T. cruzi*, onde desempenham suas funções pró-inflamatórias envolvidas no controle parasitário. No estágio tardio da infecção, citocinas anti-inflamatórias prevalecem no

coração para evitar dano tecidual. A IL-10 no coração dos animais infectados com *T. cruzi* provavelmente age sobre os macrófagos M1 polarizando-os para o fenótipo M2, cujas funções estão relacionadas com o controle da inflamação cardíaca.

Apesar de haver trabalhos indicando que a IL-27 é capaz de promover preferencialmente Tregs clássicas (WANG *et al.*, 2012), a maioria dos estudos sugere o papel crucial desta citocina na indução de Tregs semelhantes às Tr1 (POT *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2011). Nossos dados indicam que a IL-27 não tem efeito indutor sobre células T reguladoras clássicas, caracterizadas pela expressão de Foxp3, durante a infecção com *T. cruzi*. Embora o parasito tenha induzido células T reguladoras clássicas no período tardio da infecção – 21º dia –, estas células concentraram-se preferencialmente no timo e no baço dos animais WT expressando GFP sob a região promotora de Foxp3. O linfonodo mediastino, o qual drena o tecido cardíaco, não foi local de destino destas Tregs clássicas na presença do parasito. Fortalecendo esses dados, nossos resultados mostram claramente que a IL-27 induz somente células semelhantes às Tr1 no tecido cardíaco dos animais infectados.

iTregs são classicamente geradas na periferia a partir da exposição de linfócitos T CD4⁺ a altos níveis de TGF- β (BEAL *et al.*, 2012). Células Th17 também podem ser polarizadas para iTregs através da exposição ao TGF- β , o qual altera o programa gênico dos linfócitos Th17, com repressão do fator de transcrição ROR γ T e expressão de Foxp3 (BLUESTONE *et al.*, 2009). As iTregs produzem altos níveis de IL-10, citocina necessária para a modulação da resposta imune inflamatória. Além do TGF- β , novos mediadores estão sendo descritos com função anti-inflamatória semelhante. Tal qual a IL-10, a IL-27, produzida exclusivamente por macrófagos e células dendríticas, também é um mediador solúvel relacionado com o desenvolvimento de iTregs (HALL *et al.*, 2012a). Diferentemente das iTregs convencionais, as iTregs geradas na presença da IL-27 caracterizam-se pela alta produção de IL-10 e de IFN- γ (HALL *et al.*, 2012a).

Diversos receptores da imunidade inata foram evolutivamente selecionados e adaptados para o reconhecimento de moléculas constituintes de patógenos (PAMPs) ou moléculas causadoras de dano celular (DAMPs) (TRINCHIERI e SHER, 2007; HORNING e LATZ, 2010). Alguns desses receptores atuam no reconhecimento do *T. cruzi*, iniciando o desenvolvimento de uma resposta inflamatória com o intuito de controlar a replicação parasitária. Ao invadir o hospedeiro, o *T. cruzi* permanece no meio extracelular antes de interagir com células específicas como os macrófagos. Neste átimo, o reconhecimento do parasito acontece através da interação de moléculas conservadas presentes na superfície do *T. cruzi* com receptores da imunidade inata expressos na superfície celular de macrófagos, como TLR2 e TLR4 (CAMPOS *et al.*, 2001; MEDEIROS *et al.*, 2007). Após a penetração no interior dos macrófagos, os parasitos tornam-se inacessíveis aos TLR2 e TLR4. No meio intracelular, porém, outros receptores reconhecem o *T. cruzi*, amplificando a resposta inflamatória. Dentre estes receptores intracelulares destacam-se os TLR7 e TLR9 (BAFICA *et al.*, 2006; CAETANO *et al.*, 2011), os quais estão ancorados na membrana endossomal, e os NOD1 (SILVA *et al.*, 2010), AIM2 e NLRP3 (GONCALVES *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013), localizados no citoplasma celular. Nosso trabalho mostra claramente que o reconhecimento do *T. cruzi* pelos receptores TLR4, TLR9 e NLRP3 é essencial para a produção de IL-27 por macrófagos. Em contrapartida, o reconhecimento do parasito pelo TLR2 expresso na superfície de macrófagos não foi crítico para a produção desta citocina. Nossos dados, no entanto, não excluem a participação dos receptores NOD1 e AIM2 na produção de IL-27 por macrófagos.

Estruturalmente, a IL-27 é constituída pelas subunidades Ebi3 e IL-27p28, porém certas peculiaridades devem ser destacadas. Um ponto a ser realçado refere-se ao fato de que estas subunidades podem ser secretadas independentemente (HUNTER e KASTELEIN, 2012). Mesmo na ausência da IL-27 inteira (complexo Ebi3/IL-27p28), a presença somente de uma ou outra

subunidade já é suficiente para exercer funções supressoras. A ação somente da subunidade IL-27p28 já é suficiente para antagonizar discretamente respostas Th17; isto nos permite sugerir que a expressão acentuada desta subunidade teria efeitos biológicos formidáveis no controle de doenças auto-imunes mediadas pelos linfócitos Th17 (STUMHOFER *et al.*, 2010). Outra peculiaridade que merece atenção é a capacidade da Ebi3 ou da IL-27p28 de formar complexos com outras subunidades, gerando novas citocinas. Um exemplo claro desta promiscuidade estrutural entre as citocinas é exercida pela Ebi3, a qual pode se associar com a IL-12p35 para formar outra citocina reguladora denominada de IL-35 (VIGNALI e KUCHROO, 2012). A IL-27p28 também possui propriedades similares de associação com outras subunidades. Esta subunidade, ao interagir com o fator 1 semelhante à citocina (do inglês *cytokine-like factor 1* ou CLF), pode promover a ativação de células de células T e NK (CRABE *et al.*, 2009).

A similaridade entre a IL-27 e a IL-35 poderia ser, de alguma forma, critério de confusão durante a interpretação dos nossos dados. Além disso, as ferramentas disponíveis nos limitam a avaliar pormenorizadamente as funções da IL-27 no nosso modelo. Deliberar acerca das características intrínsecas da IL-27 na doença de Chagas pressupõe, sob certos aspectos, um olhar criterioso. Nossos dados compilados reiteram a função supressora desta citocina, cujo efeito biológico controla a intensa miocardite mediada pelos linfócitos Th1, os principais vilões da doença de Chagas. Entretanto, os nossos dados não refutam uma possível participação da IL-35 na infecção com *T. cruzi*.

Os resultados obtidos em modelos animais nem sempre são condizentes com o que acontece em humanos. A extrapolação dos dados deve ser minuciosamente avaliada para evitar quaisquer percalços no desenvolvimento de futuras terapias. Como o número de amostras analisadas no nosso estudo não é satisfatoriamente adequado para fazermos qualquer alusão acerca do papel protetor da IL-27 na doença de Chagas, a extrapolação dos dados obtidos com

IL-27 no nosso modelo deve ser encarada com certo grau de ceticismo. Incorre como agravante o fato de que nenhum estudo descrito na literatura obteve associação positiva entre os níveis séricos elevados da IL-27 e o melhor prognóstico de determinada doença em humanos. Para sanar este problema, pretendemos aumentar o número de amostras de soro de pacientes com doença de Chagas.

Apesar de insólitos, os biomarcadores são extremamente importantes para rastrear e identificar formas clínicas graves da doença de Chagas. A compilação desses dados nos permite aventar a utilização desta citocina como marcador biológico associado com menor gravidade da forma cardíaca durante a doença de Chagas. A diminuição sérica da IL-27 pode, então, ser um fator determinante da morbidade cardíaca chagásica.

Em síntese, nossos dados ressaltam a função protetora da IL-27 na infecção experimental com *T. cruzi*. Classicamente envolvidos com a eliminação do parasito por meio da produção de NO nos estágios iniciais da infecção com *T. cruzi*, os macrófagos recrutados para o tecido cardíaco são fontes essenciais de produção da IL-27 no estágio tardio da doença de Chagas. Macrófagos produtores de IL-27 induziram linfócitos semelhantes às Tr1, os quais produziram quantidade acentuada de IL-10, mediando a supressão de linfócitos Th1 no tecido cardíaco e controlando a miocardite chagásica.

6 CONCLUSÃO

O parasito *T. cruzi* pode estimular receptores da imunidade inata e induzir a produção de IL-27 por macrófagos, cuja ação promove a indução de células semelhantes às Tr1 produtoras de IL-10. Esta citocina suprime linfócitos Th1, os principais causadores de danos cardíacos, controlando assim a miocardite induzida durante a infecção experimental com *T. cruzi*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, L. C., L. V. RIZZO, B. IANNI, F. ALBUQUERQUE, F. BACAL, D. CARRARA, E. A. BOCCHI, H. C. TEIXEIRA, C. MADY, J. KALIL e E. CUNHA-NETO. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Autoimmun**, v.17, n.1, p.99-107. 2001.

ALVAREZ LORENZO, A., R. M. PASCUAL COSTA e P. MARTINEZ HERNANDEZ. [The usefulness of CK-MB isoforms in heart disease]. **Med Clin (Barc)**, v.113, n.5, p.182-8. 1999.

AMADI-OBI, A., C. R. YU, X. LIU, R. M. MAHDI, G. L. CLARKE, R. B. NUSSENBLATT, I. GERY, Y. S. LEE e C. E. EGWUAGU. TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. **Nat Med**, v.13, n.6, p.711-8. 2007.

ANDERSON, C. F., J. S. STUMHOFER, C. A. HUNTER e D. SACKS. IL-27 regulates IL-10 and IL-17 from CD4⁺ cells in nonhealing *Leishmania major* infection. **J Immunol**, v.183, n.7, p.4619-27. 2009.

APETOH, L., F. J. QUINTANA, C. POT, N. JOLLER, S. XIAO, D. KUMAR, E. J. BURNS, D. H. SHERR, H. L. WEINER e V. K. KUCHROO. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. **Nat Immunol**, v.11, n.9, p.854-61. 2010.

ARTIS, D., L. M. JOHNSON, K. JOYCE, C. SARIS, A. VILLARINO, C. A. HUNTER e P. SCOTT. Cutting edge: early IL-4 production governs the requirement for IL-27-WSX-1 signaling in the development of protective Th1 cytokine responses following *Leishmania major* infection. **J Immunol**, v.172, n.8, p.4672-5. 2004a.

ARTIS, D., A. VILLARINO, M. SILVERMAN, W. HE, E. M. THORNTON, S. MU, S. SUMMER, T. M. COVEY, E. HUANG, H. YOSHIDA, G. KORETZKY, M. GOLDSCHMIDT, G. D. WU, F. DE SAUVAGE, H. R. MILLER, C. J. SARIS, P. SCOTT e C. A. HUNTER. The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. **J Immunol**, v.173, n.9, p.5626-34. 2004b.

BAFICA, A., H. C. SANTIAGO, R. GOLDSZMID, C. ROPERT, R. T. GAZZINELLI e A. SHER. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v.177, n.6, p.3515-9. 2006.

BATTEN, M., J. LI, S. YI, N. M. KLJAVIN, D. M. DANILENKO, S. LUCAS, J. LEE, F. J. DE SAUVAGE e N. GHILARDI. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by

suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. **Nat Immunol**, v.7, n.9, p.929-36. 2006.

BAUMJOHANN, D. e K. M. ANSEL. MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity. **Nat Rev Immunol**, v.13, n.9, p.666-78. 2013.

BEAL, A. M., N. RAMOS-HERNANDEZ, C. R. RILING, E. A. NOWELSKY e P. M. OLIVER. TGF-beta induces the expression of the adaptor Ndfip1 to silence IL-4 production during iTreg cell differentiation. **Nat Immunol**, v.13, n.1, p.77-85. 2012.

BLUESTONE, J. A., C. R. MACKAY, J. J. O'SHEA e B. STOCKINGER. The functional plasticity of T cell subsets. **Nat Rev Immunol**, v.9, n.11, p.811-6. 2009.

BRENER, Z. [The therapeutic activity of furaltadone, furazolidone and furadantine in experimental infection of the mouse by "Trypanosoma cruzi"]. **Hospital (Rio J)**, v.60, p.947-51. 1961.

CAETANO, B. C., B. B. CARMO, M. B. MELO, A. CERNY, S. L. DOS SANTOS, D. C. BARTHOLOMEU, D. T. GOLENBOCK e R. T. GAZZINELLI. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with Trypanosoma cruzi. **J Immunol**, v.187, n.4, p.1903-11. 2011.

CAMPOS, M. A., I. C. ALMEIDA, O. TAKEUCHI, S. AKIRA, E. P. VALENTE, D. O. PROCOPIO, L. R. TRAVASSOS, J. A. SMITH, D. T. GOLENBOCK e R. T. GAZZINELLI. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **J Immunol**, v.167, n.1, p.416-23. 2001.

CHALMIN, F., G. MIGNOT, M. BRUCHARD, A. CHEVRIAUX, F. VEGRAN, A. HICHAMI, S. LADOIRE, V. DERANGERE, J. VINCENT, D. MASSON, S. C. ROBSON, G. EBERL, J. R. PALLANDRE, C. BORG, B. RYFFEL, L. APETOH, C. REBE e F. GHIRINGHELLI. Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. **Immunity**, v.36, n.3, p.362-73. 2012.

CHANDRA, M., H. B. TANOWITZ, S. B. PETKOVA, H. HUANG, L. M. WEISS, M. WITTNER, S. M. FACTOR, V. SHTUTIN, L. A. JELICKS, J. CHAN e J. SHIRANI. Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by Trypanosoma cruzi (Tulahuen strain). **Int J Parasitol**, v.32, n.7, p.897-905. 2002.

CHANDRASEKAR, B., P. C. MELBY, D. A. TROYER e G. L. FREEMAN. Differential regulation of nitric oxide synthase isoforms in experimental acute chagasic cardiomyopathy. **Clin Exp Immunol**, v.121, n.1, p.112-9. 2000.

CHEN, Q., N. GHILARDI, H. WANG, T. BAKER, M. H. XIE, A. GURNEY, I. S. GREWAL e F. J. DE SAUVAGE. Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. **Nature**, v.407, n.6806, p.916-20. 2000.

CHOI, K. M., P. C. KASHYAP, N. DUTTA, G. J. STOLTZ, T. ORDOG, T. SHEA DONOHUE, A. J. BAUER, D. R. LINDEN, J. H. SZURSZEWski, S. J. GIBBONS e G. FARRUGIA. CD206-positive M2 macrophages that express heme oxygenase-1 protect against diabetic gastroparesis in mice. **Gastroenterology**, v.138, n.7, p.2399-409, 2409 e1. 2010.

CRABE, S., A. GUAY-GIROUX, A. J. TORMO, D. DULUC, R. LISSILAA, F. GUILHOT, U. MAVOUNGOU-BIGOUAGOU, F. LEFOUILI, I. COGNET, W. FERLIN, G. ELSON, P. JEANNIN e J. F. GAUCHAT. The IL-27 p28 subunit binds cytokine-like factor 1 to form a cytokine regulating NK and T cell activities requiring IL-6R for signaling. **J Immunol**, v.183, n.12, p.7692-702. 2009.

DA MATTA GUEDES, P. M., F. R. GUTIERREZ, F. L. MAIA, C. M. MILANEZI, G. K. SILVA, W. R. PAVANELLI e J. S. SILVA. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4, n.2, p.e604. 2010.

DAWIE, J., R. CHAWLA, Y. WORKU e A. AZAZH. Diagnosis of ischemic heart disease using CK-MB, troponin-I and ischemia modified albumin. **Ethiop Med J**, v.49, n.1, p.25-33. 2011.

DE ARAUJO, F. F., R. CORREA-OLIVEIRA, M. O. ROCHA, A. T. CHAVES, J. A. FIUZA, R. C. FARES, K. S. FERREIRA, M. C. NUNES, T. S. KEESEN, M. P. DAMASIO, A. TEIXEIRA-CARVALHO e J. A. GOMES. Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. **Immunobiology**, v.217, n.8, p.768-77. 2012.

DHIMAN, M. e N. J. GARG. NADPH oxidase inhibition ameliorates *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis during Chagas disease. **J Pathol**, v.225, n.4, p.583-96. 2011.

DULGERIAN, L. R., V. V. GARRIDO, C. C. STEMPIN e F. M. CERBAN. Programmed death ligand 2 regulates arginase induction and modifies *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages during murine experimental infection. **Immunology**, v.133, n.1, p.29-40. 2011.

FINDLAY, E. G., R. GREIG, J. S. STUMHOFER, J. C. HAFALLA, J. B. DE SOUZA, C. J. SARIS, C. A. HUNTER, E. M. RILEY e K. N. COUPER. Essential role for IL-27 receptor signaling in prevention of Th1-mediated immunopathology during malaria infection. **J Immunol**, v.185, n.4, p.2482-92. 2010.

FUJIMOTO, H., T. HIRASE, Y. MIYAZAKI, H. HARA, N. IDE-IWATA, A. NISHIMOTO-HAZUKU, C. J. SARIS, H. YOSHIDA e K. NODE. IL-27 inhibits hyperglycemia and pancreatic islet inflammation induced by streptozotocin in mice. **Am J Pathol**, v.179, n.5, p.2327-36. 2011.

GHARIB, S. A., L. K. JOHNSTON, I. HUIZAR, T. P. BIRKLAND, J. HANSON, Y. WANG, W. C. PARKS e A. M. MANICONE. MMP28 promotes macrophage polarization toward M2 cells and augments pulmonary fibrosis. **J Leukoc Biol**. 2013.

GOMES, J. A., L. M. BAHIA-OLIVEIRA, M. O. ROCHA, O. A. MARTINS-FILHO, G. GAZZINELLI e R. CORREA-OLIVEIRA. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect Immun**, v.71, n.3, p.1185-93. 2003.

GONCALVES, V. M., K. C. MATTEUCCI, C. L. BUZZO, B. H. MIOLLO, D. FERRANTE, A. C. TORRECILHAS, M. M. RODRIGUES, J. M. ALVAREZ e K. R. BORTOLUCI. NLRP3 Controls Trypanosoma cruzi Infection through a Caspase-1-Dependent IL-1R-Independent NO Production. **PLoS Negl Trop Dis**, v.7, n.10, p.e2469. 2013.

GRAEFE, S. E., T. JACOBS, U. WACHTER, B. M. BROKER e B. FLEISCHER. CTLA-4 regulates the murine immune response to Trypanosoma cruzi infection. **Parasite Immunol**, v.26, n.1, p.19-28. 2004.

GUEDES, P. M., F. R. GUTIERREZ, G. K. SILVA, R. DELLALIBERA-JOVILIANO, G. J. RODRIGUES, L. M. BENDHACK, A. RASSI, JR., A. RASSI, A. SCHMIDT, B. C. MACIEL, J. A. MARIN NETO e J. S. SILVA. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v.6, n.4, p.e1630. 2012.

GUTIERREZ, F. R., F. S. MARIANO, C. J. OLIVEIRA, W. R. PAVANELLI, P. M. GUEDES, G. K. SILVA, A. P. CAMPANELLI, C. M. MILANEZI, M. AZUMA, T. HONJO, M. M. TEIXEIRA, J. C. ALIBERTI e J. S. SILVA. Regulation of Trypanosoma cruzi-induced myocarditis by programmed death cell receptor 1. **Infect Immun**, v.79, n.5, p.1873-81. 2011.

GWYER FINDLAY, E., A. VILLEGAS-MENDEZ, J. B. DE SOUZA, C. A. INKSON, T. N. SHAW, C. J. SARIS, C. A. HUNTER, E. M. RILEY e K. N. COUPER. IL-27 receptor signaling

regulates CD4⁺ T cell chemotactic responses during infection. **J Immunol**, v.190, n.9, p.4553-61. 2013.

HALL, A. O., D. P. BEITING, C. TATO, B. JOHN, G. OLDENHOVE, C. G. LOMBANA, G. H. PRITCHARD, J. S. SILVER, N. BOULADOUX, J. S. STUMHOFFER, T. H. HARRIS, J. GRAINGER, E. D. WOJNO, S. WAGAGE, D. S. ROOS, P. SCOTT, L. A. TURKA, S. CHERRY, S. L. REINER, D. CUA, Y. BELKAID, M. M. ELLOSO e C. A. HUNTER. The cytokines interleukin 27 and interferon-gamma promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology. **Immunity**, v.37, n.3, p.511-23. 2012a.

HALL, A. O., J. S. SILVER e C. A. HUNTER. The immunobiology of IL-27. **Adv Immunol**, v.115, p.1-44. 2012b.

HARRINGTON, L. E., R. D. HATTON, P. R. MANGAN, H. TURNER, T. L. MURPHY, K. M. MURPHY e C. T. WEAVER. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nat Immunol**, v.6, n.11, p.1123-32. 2005.

HEUSINKVELD, M., P. J. DE VOS VAN STEENWIJK, R. GOEDEMANS, T. H. RAMWADHDOEBE, A. GORTER, M. J. WELTERS, T. VAN HALL e S. H. VAN DER BURG. M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4⁺ Th1 cells. **J Immunol**, v.187, n.3, p.1157-65. 2011.

HIRAHARA, K., K. GHORESCHI, X. P. YANG, H. TAKAHASHI, A. LAURENCE, G. VAHEDI, G. SCIUME, A. O. HALL, C. D. DUPONT, L. M. FRANCISCO, Q. CHEN, M. TANAKA, Y. KANNO, H. W. SUN, A. H. SHARPE, C. A. HUNTER e J. J. O'SHEA. Interleukin-27 priming of T cells controls IL-17 production in trans via induction of the ligand PD-L1. **Immunity**, v.36, n.6, p.1017-30. 2012.

HIROTA, K., H. YOSHITOMI, M. HASHIMOTO, S. MAEDA, S. TERADAIRA, N. SUGIMOTO, T. YAMAGUCHI, T. NOMURA, H. ITO, T. NAKAMURA, N. SAKAGUCHI e S. SAKAGUCHI. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. **J Exp Med**, v.204, n.12, p.2803-12. 2007.

HOLSCHER, C., A. HOLSCHER, D. RUCKERL, T. YOSHIMOTO, H. YOSHIDA, T. MAK, C. SARIS e S. EHLERS. The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis. **J Immunol**, v.174, n.6, p.3534-44. 2005.

HORNUNG, V. e E. LATZ. Intracellular DNA recognition. **Nat Rev Immunol**, v.10, n.2, p.123-30. 2010.

HUNTER, C. A., L. A. ELLIS-NEYES, T. SLIFER, S. KANALY, G. GRUNIG, M. FORT, D. RENNICK e F. G. ARAUJO. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, v.158, n.7, p.3311-6. 1997.

HUNTER, C. A. e R. KASTELEIN. Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity. **Immunity**, v.37, n.6, p.960-9. 2012.

KALLIOLIAS, G. D., R. A. GORDON e L. B. IVASHKIV. Suppression of TNF-alpha and IL-1 signaling identifies a mechanism of homeostatic regulation of macrophages by IL-27. **J Immunol**, v.185, n.11, p.7047-56. 2010.

KRAUSGRUBER, T., K. BLAZEK, T. SMALLIE, S. ALZABIN, H. LOCKSTONE, N. SAHGAL, T. HUSSELL, M. FELDMANN e I. A. UDALOVA. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. **Nat Immunol**, v.12, n.3, p.231-8. 2011.

LAROUSSE, F., P. CHARLOT, E. BARDEL, J. FROGER, R. A. KASTELEIN e O. DEVERGNE. Differential effects of IL-27 on human B cell subsets. **J Immunol**, v.176, n.10, p.5890-7. 2006.

LIU, C. Y., J. Y. XU, X. Y. SHI, W. HUANG, T. Y. RUAN, P. XIE e J. L. DING. M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. **Lab Invest**, v.93, n.7, p.844-54. 2013.

MAGALHAES, L. M., F. N. VILLANI, C. NUNES MDO, K. J. GOLLOB, M. O. ROCHA e W. O. DUTRA. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. **J Infect Dis**, v.207, n.4, p.661-5. 2013.

MARIM, F. M., T. N. SILVEIRA, D. S. LIMA, JR. e D. S. ZAMBONI. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PLoS One**, v.5, n.12, p.e15263. 2010.

MARIN-NETO, J. A., E. CUNHA-NETO, B. C. MACIEL e M. V. SIMOES. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v.115, n.9, p.1109-23. 2007.

MARTINS, G. A., C. E. TADOKORO, R. B. SILVA, J. S. SILVA e L. V. RIZZO. CTLA-4 blockage increases resistance to infection with the intracellular protozoan *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, v.172, n.8, p.4893-901. 2004.

MASCANFRONI, I. D., A. YESTE, S. M. VIEIRA, E. J. BURNS, B. PATEL, I. SLOMA, Y. WU, L. MAYO, R. BEN-HAMO, S. EFRONI, V. K. KUCHROO, S. C. ROBSON e F. J. QUINTANA. IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39. **Nat Immunol**, v.14, n.10, p.1054-63. 2013.

MAYER, K. D., K. MOHRS, W. REILEY, S. WITTMER, J. E. KOHLMEIER, J. E. PEARL, A. M. COOPER, L. L. JOHNSON, D. L. WOODLAND e M. MOHRS. Cutting edge: T-bet and IL-27R are critical for in vivo IFN-gamma production by CD8 T cells during infection. **J Immunol**, v.180, n.2, p.693-7. 2008.

MEDEIROS, M. M., J. R. PEIXOTO, A. C. OLIVEIRA, L. CARDILO-REIS, V. L. KOATZ, L. VAN KAER, J. O. PREVIATO, L. MENDONCA-PREVIATO, A. NOBREGA e M. BELLIO. Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent proinflammatory and immunomodulatory properties of the glycoinositolphospholipid (GIPL) from *Trypanosoma cruzi*. **J Leukoc Biol**, v.82, n.3, p.488-96. 2007.

METZ, G., Y. CARLIER e B. VRAY. *Trypanosoma cruzi* upregulates nitric oxide release by IFN-gamma-preactivated macrophages, limiting cell infection independently of the respiratory burst. **Parasite Immunol**, v.15, n.12, p.693-9. 1993.

MIYAZAKI, Y., S. HAMANO, S. WANG, Y. SHIMANO, Y. IWAKURA e H. YOSHIDA. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v.185, n.2, p.1150-7. 2010.

MONCAYO, A. e M. I. ORTIZ YANINE. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Ann Trop Med Parasitol**, v.100, n.8, p.663-77. 2006.

MONCAYO, A. e A. C. SILVEIRA. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104 Suppl 1, p.17-30. 2009.

MORAES, A. S., R. F. PAULA, F. PRADELLA, M. P. SANTOS, E. C. OLIVEIRA, F. VON GLEHN, D. S. CAMILO, H. CERAGIOLI, A. PETERLEVITZ, V. BARANAUSKAS, W. VOLPINI, A. S. FARIAS e L. M. SANTOS. The suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells induced by multiwalled carbon nanotubes reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. **CNS Neurosci Ther**, v.19, n.9, p.682-7. 2013.

MOSMANN, T. R. e R. L. COFFMAN. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**, v.7, p.145-73. 1989.

MUNOZ-FERNANDEZ, M. A., M. A. FERNANDEZ e M. FRESNO. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. **Immunol Lett**, v.33, n.1, p.35-40. 1992.

OESTREICH, K. J. e A. S. WEINMANN. Master regulators or lineage-specifying? Changing views on CD4+ T cell transcription factors. **Nat Rev Immunol**, v.12, n.11, p.799-804. 2012.

OLIVEIRA, A. C., J. R. PEIXOTO, L. B. DE ARRUDA, M. A. CAMPOS, R. T. GAZZINELLI, D. T. GOLENBOCK, S. AKIRA, J. O. PREVIATO, L. MENDONCA-PREVIATO, A. NOBREGA e M. BELLIO. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. **J Immunol**, v.173, n.9, p.5688-96. 2004.

PFLANZ, S., L. HIBBERT, J. MATTSON, R. ROSALES, E. VAISBERG, J. F. BAZAN, J. H. PHILLIPS, T. K. MCCLANAHAN, R. DE WAAL MALEFYT e R. A. KASTELEIN. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. **J Immunol**, v.172, n.4, p.2225-31. 2004.

PFLANZ, S., J. C. TIMANS, J. CHEUNG, R. ROSALES, H. KANZLER, J. GILBERT, L. HIBBERT, T. CHURAKOVA, M. TRAVIS, E. VAISBERG, W. M. BLUMENSCHN, J. D. MATTSON, J. L. WAGNER, W. TO, S. ZURAWSKI, T. K. MCCLANAHAN, D. M. GORMAN, J. F. BAZAN, R. DE WAAL MALEFYT, D. RENNICK e R. A. KASTELEIN. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. **Immunity**, v.16, n.6, p.779-90. 2002.

POT, C., L. APETO, A. AWASTHI e V. K. KUCHROO. Induction of regulatory Tr1 cells and inhibition of T(H)17 cells by IL-27. **Semin Immunol**, v.23, n.6, p.438-45. 2011.

POT, C., H. JIN, A. AWASTHI, S. M. LIU, C. Y. LAI, R. MADAN, A. H. SHARPE, C. L. KARP, S. C. MIAW, I. C. HO e V. K. KUCHROO. Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells. **J Immunol**, v.183, n.2, p.797-801. 2009.

RAES, G., P. DE BAETSELIER, W. NOEL, A. BESCHIN, F. BROMBACHER e G. HASSANZADEH GH. Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. **J Leukoc Biol**, v.71, n.4, p.597-602. 2002.

REED, S. G. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **J Immunol**, v.140, n.12, p.4342-7. 1988.

RODRIGUES, M. M., M. RIBEIRAO e S. B. BOSCARDIN. CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. **Immunol Lett**, v.73, n.1, p.43-50. 2000.

RODRIGUEZ, A. M., D. AFCHAIN, F. SANTORO, H. BAZIN e A. CAPRON. Parasitological and immunological aspects of *Trypanosoma cruzi* infection in nude rats. **Z Parasitenkd**, v.69, n.2, p.141-7. 1983.

ROFFE, E., A. G. ROTHFUCHS, H. C. SANTIAGO, A. P. MARINO, F. L. RIBEIRO-GOMES, M. ECKHAUS, L. R. ANTONELLI e P. M. MURPHY. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v.188, n.2, p.649-60. 2012.

SAKAGUCHI, S., D. A. VIGNALI, A. Y. RUDENSKY, R. E. NIEC e H. WALDMANN. The plasticity and stability of regulatory T cells. **Nat Rev Immunol**, v.13, n.6, p.461-7. 2013.

SCHAUB, G. A., C. HOLSCHER e H. MOSSMANN. Development of high numbers of blood trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* in nude rats. **Parasitol Res**, v.87, n.3, p.245-7. 2001.

SILVA, G. K., R. S. COSTA, T. N. SILVEIRA, B. C. CAETANO, C. V. HORTA, F. R. GUTIERREZ, P. M. GUEDES, W. A. ANDRADE, M. DE NIZ, R. T. GAZZINELLI, D. S. ZAMBONI e J. S. SILVA. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1beta response and host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v.191, n.6, p.3373-83. 2013.

SILVA, G. K., F. R. GUTIERREZ, P. M. GUEDES, C. V. HORTA, L. D. CUNHA, T. W. MINEO, J. SANTIAGO-SILVA, K. S. KOBAYASHI, R. A. FLAVELL, J. S. SILVA e D. S. ZAMBONI. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v.184, n.3, p.1148-52. 2010.

SOARES, M. B., K. N. SILVA-MOTA, R. S. LIMA, M. C. BELLINTANI, L. PONTES-DE-CARVALHO e R. RIBEIRO-DOS-SANTOS. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. **Am J Pathol**, v.159, n.2, p.703-9. 2001.

STUMHOFER, J. S. e C. A. HUNTER. Advances in understanding the anti-inflammatory properties of IL-27. **Immunol Lett**, v.117, n.2, p.123-30. 2008.

STUMHOFER, J. S., E. D. TAIT, W. J. QUINN, 3RD, N. HOSKEN, B. SPUDY, R. GOENKA, C. A. FIELDING, A. C. O'HARA, Y. CHEN, M. L. JONES, C. J. SARIS, S. ROSE-JOHN, D. J. CUA, S. A. JONES, M. M. ELLOSO, J. GROTZINGER, M. P. CANCRO, S. D. LEVIN e C. A. HUNTER. A role for IL-27p28 as an antagonist of gp130-mediated signaling. **Nat Immunol**, v.11, n.12, p.1119-26. 2010.

TEIXEIRA, D. E., M. BENCHIMOL, P. H. CREPALDI e W. DE SOUZA. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v.6, n.8, p.e1749. 2012.

TOSELLO BOARI, J., M. C. AMEZCUA VESELY, D. A. BERMEJO, M. C. RAMELLO, C. L. MONTES, H. CEJAS, A. GRUPPI e E. V. ACOSTA RODRIGUEZ. IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. **PLoS Pathog**, v.8, n.4, p.e1002658. 2012.

TRINCHIERI, G. e A. SHER. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nat Rev Immunol**, v.7, n.3, p.179-90. 2007.

VESPA, G. N., F. Q. CUNHA e J. S. SILVA. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect Immun**, v.62, n.11, p.5177-82. 1994.

VIGNALI, D. A., L. W. COLLISON e C. J. WORKMAN. How regulatory T cells work. **Nat Rev Immunol**, v.8, n.7, p.523-32. 2008.

VIGNALI, D. A. e V. K. KUCHROO. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. **Nat Immunol**, v.13, n.8, p.722-8. 2012.

VILLARINO, A., L. HIBBERT, L. LIEBERMAN, E. WILSON, T. MAK, H. YOSHIDA, R. A. KASTELEIN, C. SARIS e C. A. HUNTER. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. **Immunity**, v.19, n.5, p.645-55. 2003.

VILLARINO, A. V., J. S. STUMHOFER, C. J. SARIS, R. A. KASTELEIN, F. J. DE SAUVAGE e C. A. HUNTER. IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. **J Immunol**, v.176, n.1, p.237-47. 2006.

WANG, H., R. MENG, Z. LI, B. YANG, Y. LIU, F. HUANG, J. ZHANG, H. CHEN e C. WU. IL-27 induces the differentiation of Tr1-like cells from human naive CD4⁺ T cells via the phosphorylation of STAT1 and STAT3. **Immunol Lett**, v.136, n.1, p.21-8. 2011.

WANG, R. X., C. R. YU, R. M. MAHDI e C. E. EGWUAGU. Novel IL27p28/IL12p40 cytokine suppressed experimental autoimmune uveitis by inhibiting autoreactive Th1/Th17 cells and promoting expansion of regulatory T cells. **J Biol Chem**, v.287, n.43, p.36012-21. 2012.

WEAVER, C. T. e R. D. HATTON. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. **Nat Rev Immunol**, v.9, n.12, p.883-9. 2009.

WILSON, C. B., E. ROWELL e M. SEKIMATA. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. **Nat Rev Immunol**, v.9, n.2, p.91-105. 2009.

XIAO, S., H. JIN, T. KORN, S. M. LIU, M. OUKKA, B. LIM e V. K. KUCHROO. Retinoic acid increases Foxp3⁺ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. **J Immunol**, v.181, n.4, p.2277-84. 2008.

XU, J., Y. YANG, G. QIU, G. LAL, N. YIN, Z. WU, J. S. BROMBERG e Y. DING. Stat4 is critical for the balance between Th17 cells and regulatory T cells in colitis. **J Immunol**, v.186, n.11, p.6597-606. 2011.

YOSHIDA, H., S. HAMANO, G. SENALDI, T. COVEY, R. FAGGIONI, S. MU, M. XIA, A. C. WAKEHAM, H. NISHINA, J. POTTER, C. J. SARIS e T. W. MAK. WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to L. major infection. **Immunity**, v.15, n.4, p.569-78. 2001.

YOSHIDA, H. e Y. MIYAZAKI. Regulation of immune responses by interleukin-27. **Immunol Rev**, v.226, p.234-47. 2008.

ZHU, J., T. S. DAVIDSON, G. WEI, D. JANKOVIC, K. CUI, D. E. SCHONES, L. GUO, K. ZHAO, E. M. SHEVACH e W. E. PAUL. Down-regulation of Gfi-1 expression by TGF-beta is important for differentiation of Th17 and CD103⁺ inducible regulatory T cells. **J Exp Med**, v.206, n.2, p.329-41. 2009.