

DANNI YOHANI SANTANA ROSERO

Estudo do envolvimento da molécula MyD88 na infecção
de cardiomiócitos pelo *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

DANNI YOHANI SANTANA ROSERO

Estudo do envolvimento da molécula MyD88 na infecção
de cardiomiócitos pelo *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Maria Álvarez Mosig

Versão original

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Santana Rosero , Danni Yohani
Estudo do envolvimento da molécula MyD88 na
infecção de cardiomiócitos pelo Trypanosoma cruzi /
Danni Yohani Santana Rosero ; orientador José
Maria Álvarez Mosig. -- São Paulo, 2016.
69 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Trypanosoma cruzi. 2. Cardiomiócitos. 3.
Cardiomiopatia. 4. Doença de Chagas. 5. Adaptador
MyD88. I. Álvarez Mosig, José Maria , orientador.
II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Danni Yohani Santana Rosero

Título da Dissertação/Tese: Estudo do envolvimento da molécula MyD88 na infecção de cardiomiócitos pelo *Trypanosoma cruzi*

Orientador: José Maria Álvarez Mosig

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **126** nas fls. **25** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **José Maria Alvarez Mosig**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Estudo do envolvimento da molécula MyD88 nos cardiomiócitos de camundongos infectados pelo Trypanosoma cruzi*" do qual participam o(s) aluno(s) **Danni Yohani Santana Rosero**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **23.02.2015, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 23 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador- CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho a três pessoas muito especiais em minha vida que me ajudaram a ser uma melhor pessoa, a minha avó Aurelia Mauna, a minha mãe Aide Rosero e a meu irmão Luis Felipe Hurtado. Por me dar apoio, constante motivação e por acreditar que este sonho era possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, principalmente, à Deus, por me dar a oportunidade de chegar à este lugar tão maravilhoso, onde teve a chance de estudar, e de conhecer pessoas muito sensacionais que estiveram sempre do meu lado. Deus me colocou no lugar certo, no momento certo, e com as pessoas certas para conseguir este sonho.

Agradeço infinitamente a minha família por me oferecer apoio todo o tempo, especialmente a minha avó Aurélia Mauna e a minha mãe Aide Rosero, que foram minha força e minha esperança nos momentos mais difíceis da minha vida. Graças a elas e a meu irmão Luis Felipe Hurtado, a quem amo infinitamente e levo no meu coração, consegui culminar esta etapa tão decisiva em minha vida. Rocio, Soraida e Esperanza Rosero, minhas queridas tias e exemplo de vida, estou muito grato com vocês e com toda minha família que foram igualmente importantes neste triunfo.

Agradeço a meu orientador José Maria Álvarez Mosig (Pepe), por me conceder a oportunidade de fazer parte de seu laboratório e confiar em meu trabalho e no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos professores colaboradores Maria Luiza Moraes Barreto de Chaves, Maria Regina D'Império Lima, Sabrina Epiphânio, Cláudio Marinho, Sônia Jancar, pelo suporte nos experimentos.

Ao laboratório LBCAF e o laboratório do Biotério agradeço pela nas técnicas de biologia molecular. Especialmente a Silvia Massironi e Marcio Caldas.

Aos professores da banca de qualificação, Hiro Goto, Jean Pierre e Beatriz Stolf pela contribuição para a finalização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório Alexandra Cassado, Carol Angelo, Caio Cezar Bonfin, Henrique Borges, Isabella Cunha, Rosana Pereira, Paulo Cezar, Rafael Torquato, e Renan Siqueira, pela amizade e pelos dias compartilhados no trabalho.

Aos amigos Eduardo Pinheiros, Raíssa Fonseca e Beatriz Villa Lobos que me ajudaram no desenvolvimento do meu trabalho, com o suporte técnico e conselhos para melhorar a pesquisa. Em especial ao Rafael Moysés Salgado, Rogério do Nascimento, e Marina Fevereiro, pessoas que sempre me ajudaram, demonstrando ser grandes amigos e admiráveis pessoas.

Aos grandes amigos que foram sempre presentes com as palavras de apoio, com conselhos, e com a imensa alegria que os caracterizam. É difícil não falar de todos eles,

mas especialmente agradeço a Dario Mauna e Didier Sanchez que apesar da distancia nunca se esqueceram de mim e se tornaram meus irmãos. A Luisa Camila Barragán, uma mulher muito especial em minha vida e que levo sempre presente agradeço por suas lindas frases e apoio incondicional e pelo seu grande amor.

Também queria deixar meu agradecimento ao corpo técnico administrativo e acadêmico do departamento de imunologia. Sobretudo Sr. Otacílio, Sr. Milton, Sr. Delman, da portaria, Sra Maria Eni e Sr João, da secretaria, ao Sr. Israel Lima, do Biotério de quarentena, a Sra Maria Áurea pelo suporte técnico do laboratório e também pelo café de todos os dias, e à Sra Silvana pelo suporte técnico de laboratório.

Finalmente agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

RESUMO

Santana DY. Estudo do envolvimento da molécula MyD88 na infecção de cardiomiócitos pelo *Trypanosoma cruzi*. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

A cardiomiopatia chagásica crônica é a consequência mais grave da Doença de Chagas, quadro infeccioso humano causado pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Uma vez que os cardiomiócitos podem ser invadidos pelo *T. cruzi*, é nosso interesse averiguar se esta população estrutural reconhece o parasita *in vivo* através dos TLRs ("Toll Like receptors"). Visto que a maioria dos TLRs sinaliza através da molécula adaptadora MyD88, no presente trabalho temos estudado a participação deste elemento transdutor. Para isto fomos examinar a infecção pelo *T. cruzi* em camundongos F2 (Mer / MyD88^{flox+/+}), modelo animal no qual o tratamento com a droga Tamoxifeno deve eliminar a molécula MyD88 exclusivamente nos cardiomiócitos. **Resultados:** em um estudo prévio, constatamos que cardiomiócitos tumorais murinos HL-1, em repouso ou após infecção pelo *T. cruzi*, transcrevem a molécula MyD88. A seguir, validamos o modelo experimental *in vivo*, ao mostrar que o tratamento com tamoxifeno dos animais F2 resulta na diminuição de MyD88 no coração, mas não no baço. Ainda, constatamos que a transcrição de MyD88 é mais intensa na aurícula do que no ventrículo, sendo igualmente abolida dos animais F2 pelo tratamento com tamoxifeno. Por outro lado, verificamos que o tamoxifeno determina um aumento da parasitemia em ambos os animais F2 e controle (MerCreMer^{+/+}), não se observando diferenças significativamente entre estes. Finalmente, estudos preliminares mostraram que a eliminação de MyD88 nos cardiomiócitos dos animais F2 não altera significativamente o quadro de patologia (parasitismo e infiltração leucocitária) aos 10 ou 28 dias de infecção pelo *T. cruzi*, quando comparado ao de animais controle (MerCreMer^{+/+}) igualmente tratados com tamoxifeno e infectados.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Cardiomiócitos. Cardiomiopatia. Doença de Chagas. Adaptador MyD88. Receptor de estrógeno.

ABSTRACT

Santana DY. Study of the involvement of MyD88 molecule in infected cardiomyocytes *Trypanosoma cruzi*. [dissertation (Masters thesis in Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Chronic Chagas cardiomyopathy is the most serious consequence of Chagas disease, human infectious condition caused by the *Trypanosoma cruzi* parasite. Since cardiomyocytes can be invaded by *T. cruzi*, it is our interest to see if this structural population recognizes the parasite *in vivo* through TLRs ("Toll Like Receptors"). Since most of the TLRs signaling through the adapter molecule MyD88, in this work we have studied the participation of this element transducer. For this, we examined the infection with *T. cruzi* in mice F2 (Mer / MyD88flox + / +), animal model in which treatment with Tamoxifen drug should eliminate MyD88 molecule exclusively in cardiomyocytes. Results: In a previous study, we found that cardiomyocytes tumor murine HL-1, at rest or after infection with *T. cruzi*, transcribe the MyD88 molecule. Next, validate the *in vivo* experimental model to show that tamoxifen treatment of F2 animals results in decreasing the MyD88 heart, but not in the spleen. Furthermore, we found that transcription of MyD88 is more intense in the atria than in the ventricle, and is also abolished the F2 animals by treatment with tamoxifen. Moreover, we found that tamoxifen causes an increase in parasitemia in both F2 and control animals (MerCreMer + / +), no statistically significant differences between them. Finally, preliminary studies have shown that the elimination of MyD88 in cardiomyocytes of F2 animals does not significantly alter the pathology frame (parasitism and leukocyte infiltration) to 10 or 28 days of *T. cruzi* infection when compared to control animals (MerCreMer + / +) also treated with tamoxifen and infected.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Cardiomyocytes. Cardiomyopathy. Adapter MyD88 Chagas disease. Estrogen receptor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação esquemática dos principais TLRs que reconhecem <i>T. Cruzi</i>	26
Figura 2- Representação esquemática do sistema Cre-Lox.....	30
Figura 3- Expressão gênica de MyD88 em coração e células HL-1.....	40
Figura 4- Análise da expressão proteica de MyD88 em células HL-1 por Western Blotting.....	41
Figura 5- Genotipagem dos camundongos do grupo experimental.....	42
Figura 6- Expressão gênica (PCR) de MyD88 após tratamento com tamoxifeno.....	45
Figura 7- Expressão gênica (PCR) de MyD88 em camundongos C57BL/6 não tratados com tamoxifeno e camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+) tratados com tamoxifeno.....	46
Figura 8- Expressão (PCR) de MyD88 em átrio e ventrículo de camundongos MerCreMer+/+ comparados com camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+).....	47
Figura 9- Análise da expressão proteica de MyD88 por Western Blotting.....	48
Figura 10- Curvas de parasitemia dos animais tratados com tamoxifeno e infectados com 10 ³ parasitas via Intraperitoneal (i.p.), uma ou três semanas mais tarde.....	50
Figura 11- Parasitemia patente dos animais tratados com tamoxifeno ou óleo de girasol e infectados com 10 ³ parasitas	51
Figura 12- Análise de parasitemia patente (A) e porcentagem de sobrevivência (B) em camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	53
Figura 13- Carga parasitaria no coração de camundongos MerCreMer+/+ e F2 (Mer / MyD88flox+/+).....	54

Figura 14- Peso do coração dos animais tratados com tamoxifeno.....	55
Figura 15- Número de ninhos no coração de animais MerCreMer+/+ e F2 (Mer / MyD88flox+/+) Tratados com tamoxifeno e infectados com 5×10^2 parasitas i.p.....	56
Figura 16- Número de ninhos no átrio e ventrículo dos animais F2 (Mer / MyD88flox+/+).....	57
Figura 17- Análise histopatológico no coração no dia 10 p.i.....	58
Figura 18. Peso do coração dos animais MerCreMer+/+ e F2 (Mer / MyD88flox+/+).....	59
Figura 19- Análise histopatológico no coração no dia 28 p.i.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA: Albumina Sérica Bovina.

CCC: Cardiomiopatia chagásica crônica.

cDNA: do inglês “complementary deoxyribonucleic acid” (ácido desoxirribonucleico complementar).

CLR: do inglês “C-type lectin receptors” (receptor do tipo lectina).

DAMPs: do inglês “Damage-associated molecular patterns” (denominados padrões moleculares associados a danos).

GPI: do inglês “Glycosylphosphatidylinositol” (glico-inositol-fosfolipídio).

HL-1: do inglês “Cardiac muscle Cell Line”.

i.p.: via intraperitoneal.

Ig: imunoglobulina.

IL: interleucina.

INF- γ : do inglês, “interferon-gamma”.

iNOS: do inglês “inducible nitric oxide synthase (indutor da síntese de óxido nítrico).

LBD: do inglês “ligand-binding domain” (Domínio de ligação).

LIT: do inglês “liver infusion tryptose”.

LLCMK2: do inglês “Rhesus Monkey Kidney Cell Line”.

MBL: do inglês “Mannose-binding lectin” (lectina de ligação da manose).

MyD88: fator de diferenciação mielóide 88.

NLR: do inglês “nod-like receptors” (receptor do tipo Nod).

NO: do inglês “nitric oxide” (óxido nítrico).

Nod: do inglês “nucleotide-binding oligomerization domain” (domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos).

OMS: Organização Mundial da Saúde.

PAMPs: do inglês “Pathogen-associated molecular patterns” (padrões moleculares associados aos patógenos).

PBS: do inglês “Phosphate Buffered Saline” (tampão fosfato salino).

p.i.: pós infecção.

PRR: do inglês “pattern recognition receptors” (receptores de reconhecimento de padrões).

qRT-PCR: do inglês, “real-time reverse transcription polymerase chain reaction” (transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase em tempo real).

RE: Receptor de estrógeno.

RIG: (RLRs, que respondem aos ácidos nucleicos de vírus).

RLR: do inglês “RIG-I-like receptors” (Receptores do tipo RIG).

RNA: do inglês “ribonucleic acid” (ácido ribonucleico).

SFB: soro fetal bovino.

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*.

TLR: do inglês “toll-like receptor “(receptor do tipo toll).

TNF: fator de necrose tumoral.

WT: do inglês “wild type”.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Doença de Chagas	18
1.1.1 Miocardiopatia Chagásica	20
1.2 Resposta imune ao <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.2.1 Reconhecimento do <i>Trypanosoma cruzi</i> pelos PRRs	22
1.2.1.1 Receptores tipo NOD (NLRs)	22
1.2.1.2 Reconhecimento mediado por TLRs	23
1.2.1.2.1 Adaptador <i>MyD88</i>	26
1.3 Abordagem experimental	27
1.4 Receptor de estrógeno	27
1.5 Sistema Cre-Lox	28
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos e abordagem das técnicas utilizadas	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Cultura de células HL1	31
3.2 Extração de RNA, síntese de cDNA e amplificação por PCR do tempo real (real time)	31
3.3 Grupos de camundongos	32
3.3.1 Obtenção da colônia de animais F2 (<i>Mer / MyD88flox+/+</i>)	32
3.4 Técnica de genotipagem (Extração de sangue dos camundongos, Técnica de PCR, e Corrida Eletroforética)	33
3.4.1 Extração de sangue dos camundongos	33
3.4.2 Técnica de PCR para genotipagem	33
3.5 Análise da expressão proteica por Western Blotting	34
3.6 Deleção do <i>MyD88</i> no cardiomiócito: Tratamento com Tamoxifeno®	36

3.7 Infecção de camundongos com <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
3.7.1 Análise de histopatologia.....	36
3.8 Avaliação da presença de parasitas vivos no coração.....	37
3.9 Análise estatística.....	37
4 RESULTADOS.....	38
4.1 Avaliação “in vitro” da expressão gênica da molécula MyD88 em cardiomiócitos HL-1 após a infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
4.2 Avaliação “in vitro” da expressão protéica da molécula MyD88 em cardiomiócitos HL-1 após a infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
4.3 Obtenção dos animais duplamente transgênicos F2 (Mer / MyD88flox +/+).....	41
4.3.1 Avaliação do tratamento com tamoxifeno na expressão gênica de MyD88 no coração dos animais duplamente transgênicos F2 (Mer / MyD88flox +/+)......	42
4.3.2 Avaliação do tratamento com tamoxifeno na expressão proteica de MyD88 no coração dos animais duplamente transgênicos F2 (Mer / MyD88flox +/+)......	47
4.3.3 Avaliação da parasitemia em animais C57BL6 infectados após tratamento com tamoxifeno.....	49
4.3.4 Importância da molécula MyD88 do coração na parasitemia e na sobrevivência de camundongos infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	51
4.3.5 Análise da carga parasitaria do coração nos camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+) e MerCreMer+/+ tratados com tamoxifeno e infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> da cepa Y.....	53
4.3.6 Avaliação histopatológica do coração nos camundongos F2 (Mer / MyD88flox +/+) e MerCreMer+/+ tratados com tamoxifeno e infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> da cepa Y por 10 dias.	54
4.3.7 Avaliação histopatológica do coração nos camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+) e MerCreMer+/+ tratados com tamoxifeno e infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> da cepa Y por 28 dias.	58
5 DISCUSSÃO.....	61
6 CONCLUSÕES.....	64
REFERENCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Após cem anos da descoberta da infecção humana, a doença de Chagas continua sendo um grave problema socioeconômico e de saúde pública, fato influenciado por alguns fatores como a limitação do tratamento terapêutico, a difícil erradicação do barbeiro, e a transmissão da doença a animais de interesse econômico como cavalos e gado (Mathers et al., 2007).

Na atualidade a doença de Chagas não é só uma problemática de países latino-americanos, mas tem se transformado em um problema global devido à migração (Westphalen et al.,2012). De acordo com dados do ano 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou a existência de entre 6 e 7 milhões de pessoas cronicamente infectados com *T. cruzi* no mundo, principalmente na América Latina onde a doença é endêmica (World Health Organization, 2015). Além disso, a OMS estima que haja 25 milhões de pessoas que estão em risco de contrair a doença. No Brasil, estima-se que existam entre 2 e 3 milhões de infectados (Martins-Melo et al., 2012).

Estudos sobre a mortalidade causada pela doença de Chagas no Brasil, no período de 1999 a 2007, mostraram que de 8,942,217 mortes, 53,930 estiveram relacionadas com a doença, indicando assim que ainda é um problema de saúde pública no Brasil (Martins-Melo et al., 2012). Esses números retratam que a infecção por *T. cruzi* continua sendo uma doença negligenciada. Além disso, a doença de Chagas é uma das maiores causas de miocardite aguda e cardiomiopatia crônica em áreas endêmicas da América latina (Tanowitz et al.,2004).

O parasita causador da Doença de Chagas muda sua forma e seu nível infeccioso durante seu ciclo nos hospedeiros invertebrado e vertebrado (Souza, 2010). O triatomídeo vetor (popularmente denominado no Brasil de barbeiro) adquire o parasita ao se alimentar de sangue de mamífero infectado (Santos et al.,2014). Uma vez a ingesta dos tripomastigotas pelo barbeiro, quase todos eles são eliminados no intestino, mas aqueles que sobrevivem transformam-se dias depois na forma alongada ou

epimastigota. Os epimastigotas se dividem intensamente no intestino e são excretados nas fezes do vetor, na forma tripomastigota metacíclico que é altamente infecciosa para varias espécies de mamíferos incluindo humanos. A transmissão ocorre após a picada do inseto, pois este deposita suas fezes contaminadas com tripomastigotas metacíclicos na proximidade do local da picada na pele do hospedeiro. Uma vez que o parasita entra no hospedeiro vertebrado, invade células locais como macrófagos e células epiteliais, onde se transforma na forma intracelular amastigota. Após várias divisões intracelulares, os amastigotas diferenciam em tripomastigotas, que rompem as células onde replicaram e iniciam novos ciclos de infecção até chegarem ao sangue, onde disseminam a nível sistêmico infectando qualquer tipo de células, inclusive cardiomiócitos (Souza, 2010). Outras formas de transmissão da infecção no homem são por transfusão de sangue, transmissão da mãe ao filho e transmissão oral por ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas (Rassi e Marin-Neto, 2010).

Após o período de incubação nos humanos (1 e 3 semanas) inicia a fase aguda que dura cerca de dois meses e é assintomática na maioria dos indivíduos infectados, embora alguns pacientes desenvolvem febre, náuseas, vomito, diarreia, entre outros sintomas. Durante esta fase com frequência se encontram números elevados do *T. cruzi* na corrente sanguínea e nos tecidos, que promovem uma expressiva resposta imune com altos níveis de citocinas e ativação de linfócitos B e T (Junqueira, 2010 e Rodrigues, 2011). A infecção aguda também pode apresentar lesão inflamatória local na entrada do parasita (conhecida como Chagoma de inoculação), além de outros problemas como linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (Rassi, 2012). Cerca de 2% da população infectada na fase aguda (principalmente crianças) morrem devido a miocardite aguda ou meningo-encefalite. Já na fase crônica, a maioria dos indivíduos infectados não exibe sintomas da doença, mas alguns destes indivíduos infectados manifestam cardiomiopatia ou problemas digestivos de megacolon ou megaesófago (Machado et al.,2012).

O *T. cruzi* exibe ampla heterogeneidade. No presente projeto, a maior parte dos nossos estudos foi realizada com parasitas da cepa Y. Porém, nos experimentos com células HL-1 também utilizamos parasitas da cepa *Sylvio X10/4*. O *T. cruzi* da cepa Y é um parasita reticulotrópico, que infecta principalmente células da linhagem macrófágica.

No camundongo este parasita promove uma infecção de curso rápido, com altos níveis de parasitemia e mortalidade. Na fase aguda da infecção observa-se cardiomiopatia e pode haver até comprometimento do sistema nervoso central (De Souza et AL., 1996). Já o *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4 é um parasita miotrópico de baixa virulência (cursa com níveis subpatentes de parasitemia) mas em algumas linhagens de camundongos induz lesões cardíacas crônicas semelhantes às observadas em humanos, ou seja, infiltração por leucócitos, fibrose e presença de raros ninhos de amastigotas (Marinho et al., 2009).

1.1.1 Miocardiopatia Chagásica

Como indicado acima, na doença de Chagas, uma vez passada a fase aguda, 60-70% dos indivíduos infectados permanecem na chamada fase indeterminada da moléstia, não exibindo sintomas ou sinais como consequência da persistência do protozoário. O restante dos indivíduos infectados apresenta comprometimento cardíaco ou digestivo, e raramente ambos, sendo que o quadro mais devastador é a cardiopatia chagásica crônica (CCC) (Marin-Neto, 2007). Esta complicação afeta aproximadamente 30% dos indivíduos infectados e resulta em importante taxa de mortalidade por conta do desenvolvimento de arritmias e insuficiência cardíaca congestiva (Research Priorities for Chagas Disease, 2012). Manifestações típicas da cardiomiopatia Chagásica crônica (CCC) são o desenvolvimento de aneurisma apical, uma dilatação anormal da ponta do ventrículo esquerdo, e os problemas na condução do impulso elétrico-cardíaco, comumente bloqueio do ramo direito (Rassi, 2010).

Já no modelo experimental murino, algumas linhagens isogênicas de camundongos, quando infectadas por determinadas cepas do parasita, desenvolvem lesões cardíacas que a nível histopatológico se assemelham ao quadro de CCC humano (Marinho et al., 2004).

No momento desconhecemos qual (quais) a(s) causa(s) da cardiomiopatia chagásica crônica. Embora originalmente considerada o resultado de uma reação autoimune (Biolo et al., 2010 e Cunha-Neto et al., 1995), dados obtidos de pacientes chagásicos e camundongos cronicamente infectados sugerem que a patologia cardíaca

crônica esteja relacionada à persistência do parasita no tecido cardíaco. Neste contexto, o desenvolvimento das lesões resulta, não somente da destruição celular causada pelo parasita, mas também da ação do infiltrado inflamatório destinado à eliminação deste (Rassi, 2012). Desta forma, apesar de uma contribuição da autoimunidade não ter sido totalmente descartada, o problema central da doença de Chagas parece ser a persistência do *T. cruzi* no hospedeiro crônico e, no que se refere à CCC, a sua persistência no tecido cardíaco (Jones et al., 1993 e Tarleton, 2001).

1.2 Resposta imune ao *Trypanosoma cruzi*

No indivíduo infectado, o reconhecimento do *T. cruzi* depende do sistema imune inato e adquirido. A primeira linha de resposta ao parasita é o sistema imune inato, sendo que os macrófagos, células dendríticas e células natural killer são as principais populações envolvidas. Estas populações participam da detecção do parasita, e eventualmente na destruição deste. Enquanto as citocinas e quimocinas produzidas por estas células tem papel crucial na resposta inflamatória, as células dendríticas (e em menor grau os macrófagos) apresentam o antígeno para os linfócitos T, e proveem sinais coestimulatórios fundamentais para a ativação da resposta imune adquirida *T. cruzi*-específica.

Uma vez instaurada a resposta adquirida específica, os anticorpos IgG desempenham um papel fundamental na remoção das formas extracelulares do *T. cruzi*. Por outro lado, enquanto as células TCD8+ específicas ao *T. cruzi* parecem ser importantes na detecção e destruição das células infectadas (Marinho et al., 2007), as células TCD4 e TCD8 otimizam a atividade tripanocida dos macrófagos pela produção de IFN- γ (Marinho et al., 2009).

Em relação à participação das células estruturais do coração na infecção pelo *T. cruzi*, pouco se sabe sobre a interação do parasita com cardiomiócitos, fibroblastos e células endoteliais, exceto o fato de serem alvos da invasão. Em relação aos cardiomiócitos, principal população estrutural do coração e vítima no processo da CCC, evidências sugerem que os receptores TLRs participam da detecção do *T. cruzi* por estas células. Isto foi mostrado *in vitro* com cardiomiócitos isolados de camundongos

recém-nascidos, que passaram a produzir citocinas e quimiocinas após infecção pelo *T. cruzi* (Machado et al.,2000; Jorquera-Rosas et al.,resultados não publicados). Ainda, verificou-se a expressão de receptores TLRs nestas células de neonato. Contudo, estes resultados não são totalmente conclusivos, já que no processo de isolamento dos cardiomiócitos é frequente haver contaminação por fibroblastos. Por outro lado, até o momento não há evidências *in vivo* que demonstrem que, no coração do hospedeiro infectado, as moléculas TLR exibem uma participação semelhante.

1.2.1 Reconhecimento do *Trypanosoma cruzi* pelos PRRs

Os micro-organismos contém na sua estrutura moléculas altamente conservadas, conhecidas como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Entre estes há lipídios, ácidos nucleicos, carboidratos e proteínas (Rodrigues, 2011). Estes PAMPs são reconhecidos pelos receptores (PRRs; “Pattern recognition Receptors”) que ficam na superfície celular, no citossol ou na membrana dos endossomas. Além dos PAMPs, os PRRs também podem reconhecer alguns componentes próprios liberados durante o dano tissular (denominados padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Entre os diferentes PRRs podemos distinguir receptores do tipo NOD (NLRs, presentes no citosol), receptores do tipo RIG (RLRs, que respondem aos ácidos nucleicos de vírus), receptores tipo Toll (TLRs) (Kagan, 2014), receptores como a lectina de manose (MBL) denominados CLR (“C-type lectin receptors”), e receptores tipo AIM (absent-in-melanoma) ou ALRs (Kim, 2016).

Entre os receptores PRRs que reconhecem o *T. cruzi* encontram-se receptores NLRs e TLRs.

1.2.1.1 Receptores tipo NOD (NLRs)

Os receptores NOD (NLRs) são receptores citoplasmáticos que desempenham um papel crucial na resposta imune pelo reconhecimento de PAMPs e DAMPs (Kim, 2016). Todas as moléculas de reconhecimento do tipo NLR estão compostas por um domínio central NACHT, um domínio C-terminal rico em repetições de leucina (C-terminal

leucine-rich repeats (LRR) e um domínio N-terminal (Saxena, 2014). Existem quatro domínios N-terminal que são usados para classificar os NLRs em quatro subfamílias (NLRA, NLRB, (CARD; NLRC), NLRP).

A subfamília NLRA só tem um membro (MHC-II transactivator (CIITA)). Similarmente, a subfamília NLRB contém um membro NAIP. Por outro lado a subfamília NLRC apresenta seis membros (NLRC1 (NOD1), NLRC2 (NOD2), NLRC3, NLRC4, NLRC5, e NLRX1). A subfamília NLRP contém 14 membros (NLRP 1-14) (Kim, 2016). NOD1 e NOD2 foram os primeiros NLRs identificados. Estes dois receptores intracelulares cooperam com a molécula Rip2, uma proteína quinase requerida para a ativação do fator NF- κ B e, portanto requerida para a produção das citocinas e quimiocinas. Tanto o NOD1 como o NOD2 são solicitados na produção de NO, mas só o NOD1 é requerido para uma ótima produção de IFN- γ , e estas respostas são necessárias na eliminação e controle do *T. cruzi* (Silva et al., 2010). Recentemente, foi mostrada a participação do inflamossoma NLRP3 na detecção do *T. cruzi* (Silva et al., 2013 e Gonçalves et al., 2013).

1.2.1.2 Reconhecimento mediado por TLRs

Os receptores similares a Toll (TLRs), são uma classe de receptores de PAMPs e DAMPs que podem reconhecer os seus ligantes na membrana celular ou no compartimento endossômico. Os receptores TLR são glicoproteínas integrantes da membrana caracterizadas por múltiplas cópias de um motivo rico em leucina no seu domínio extracelular e um domínio TIR (originalmente definido como um domínio presente nas moléculas Toll e no receptor para IL-1). A interação dos TLRs com os seus ligantes ativa diversas vias de sinalização que culminam na translocação para o núcleo do fator de transcrição NF- κ B e da proteína ativadora AP-1 estimulando diversos genes da resposta inflamatória. Para sinalizar a maioria dos TLR usam a molécula adaptadora MyD88 (fator 88 de diferenciação mieloide), a exceção de TLR3 que usa o adaptador TRIF (Chen e Jiang, 2012) (Bartholo e Bartholo, 2009). Tanto células do sistema imune inato, como macrófagos e células dendríticas, quanto células T e B do

sistema imune adaptativo expressam receptores TLRs e por tanto o adaptador MyD88 (Hoshi et al., 2012).

Os receptores Toll presentes em camundongos e humanos são os TLRs 1-9. O TLR10 esta presente somente no homem, e os TLR11, TLR12 e TLR13 se expressam em camundongos, mas não em humanos (Rodrigues, 2011). Os TLRs expressos na superfície celular (TLRs 1,2,4,5, e 6) são os principais responsáveis da detecção de produtos da membrana microbiana. Por outro lado, os TLRs 3, 7, 8 e 9, que reconhecem ácidos nucléicos estão localizados nas membranas endossomais (Watters, 2007).

Algumas pesquisas tem mostrado a importância dos receptores TLRs na detecção do *T. cruzi* pelas células do sistema imune inato, incluindo macrófagos, células dendríticas, e células NK, contribuindo assim para o controle e eliminação do parasita na fase aguda da infecção (Campos et al., 2004). Moléculas derivadas de *T. cruzi* ativam os receptores TLR2, TLR4, TLR9 (Machado et al., 2012) e TLR7 mediante o reconhecimento de diversos PAMPs do parasita (Rodrigues, 2011).

O TLR2 reconhece âncoras GPI (glico-inositol-fosfolipidio), glicoproteínas distribuídas por toda a superfície celular de *T. cruzi* na fase tripomastigota (Campos 2001 e Gravina et al.,2013), estimulando a síntese de IL-2 por linfócitos T (Junqueira et al.,2002) e TNF- α pelos macrófagos (Coelho et al., 2002 e Gravina et al., 2013). Adicionalmente, a proteína Tc52 presente em *T. cruzi*, também é reconhecida pelo TLR2 e ativa células dendríticas (Quaissi et al., 2002).

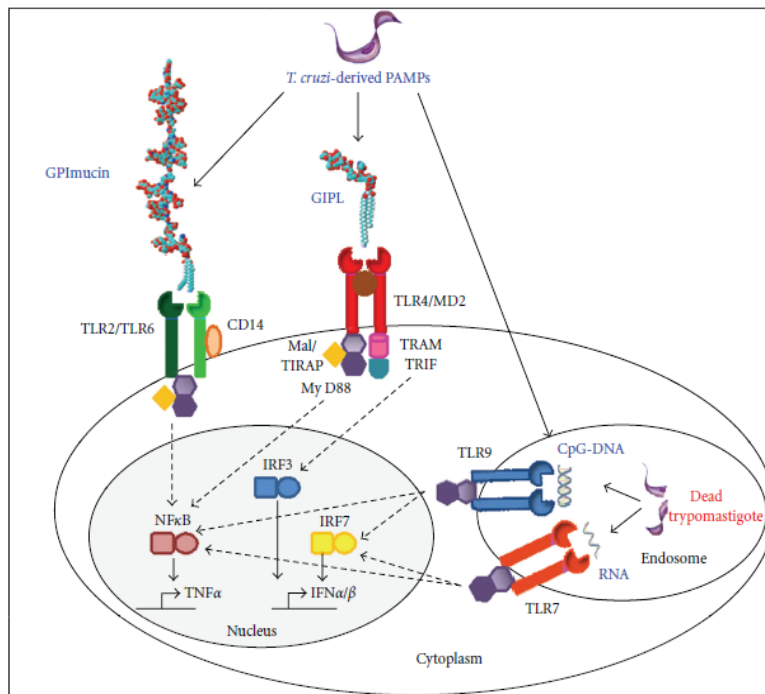


Figura 1 - Representação esquemática dos principais TLRs que reconhecem *T. cruzi*. (Fonte: Rodrigues 2011).

O TLR4 reconhece glycoinositolfosfolipídeo (eGIPL, mucina da família GPI presente na fase epimastigota) e ácidos nucleicos do *T. cruzi* que induzem ativação do fator NF-κB em macrófagos e células dendríticas (Rodrigues, 2011). Por outro lado, TLR4 é requerido para uma ótima produção de IFN-γ, TNF-α e óxido nítrico (NO) no baço de animais infectados (Oliveira et al., 2010).

O TLR9 reconhece ácidos nucleicos do *T. cruzi* (Gravina et al., 2013 e Rodrigues 2011), estabelecendo e amplificando respostas TH1 através da produção de IL-12/IL-23p40 pelas células dendríticas (Gravina et al., 2013). A IL-12 é uma potente citocina que também pode ser sintetizada por macrófagos, monócitos ou células B, que, após infecção pelo *T. cruzi*, induz a produção de IFN-γ em macrófagos, os quais aumentam sua produção de NO para o controle do tripomastigota (Aliberti et al., 1996).

Camundongos TLR4^{-/-} infectados via ip com *T. cruzi* da cepa Y (2×10^3) mostram altos níveis de parasitemia e mortalidade, e camundongos triplamente deficientes em

TLR2, TLR4 e TLR9 exibem ainda maior vulnerabilidade ao *T. cruzi* (Oliveira et al., 2010).

1.2.1.2.1 Adaptador MyD88

O fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) é uma proteína essencial na via de sinalização de IL-18R, IL-1R e dos TLRs a exceção do TLR3, via que ativa a transcrição de fatores NF- κ B e AP-1 que promovem uma resposta do sistema imune pela produção de citocinas pro inflamatórias (Chen e Jiang, 2012) (Nuñez e Warner, 2013).

O MyD88 é composto por um domínio Toll/IL-1R (TIR) que se liga ao domínio TIR do receptor ativado. MyD88 também tem um domínio de morte (death domain – DD), que após a ligação com o receptor, recruta as quinases IRAK4 e IRAK1 (Nuñez e Warner, 2013), que são fosforiladas e ativam TRAF6. O TRAF6 ativado é posteriormente ubiquitinado pela ação de Ubc 13-Uev1A, e interage com TAB2 ativando o complexo TAK1 (Wang, 2001). O TAK1 dependente do complexo (TRAF6/TAB2) ativa o complexo IKK- α e I κ -B que são fosforilados e ubiquitinados, permitindo a posterior ativação do fator NF- κ B para a produção de citocinas pro inflamatórias. TAK1 também ativa MKK6 que a sua vez ativa JNK e P38, conduzindo a ativação de AP-1 e a produção de citocinas pro inflamatórias (Watters, 2007).

Camundongos MyD88^{-/-} apresentam pouco reconhecimento de âncoras de mucinas GPI do *T. cruzi* na fase tripomastigota, e como consequência direta proporcionam uma diminuição notável da produção de citocinas pelos macrófagos. Estes animais são mais susceptíveis a infecção do parasita e apresentam altos níveis de mortalidade (Campos et al., 2004).

1.3 Abordagem experimental

No presente projeto de mestrado visamos desvendar se as moléculas TLR participam *in vivo* na detecção do *T. cruzi* por cardiomiócitos infectados e se esta detecção contribui para o controle local do parasita. Para isto utilizamos camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+), obtidos pelo cruzamento de camundongos MerCreMer+/+ e camundongos MyD88flox.

O camundongo MerCreMer+/+ (□-MHC-MerCreMer) contém, sob controle do promotor específico para a cadeia pesada de miosina cardíaca alfa, um transgene que, após tratamento com Tamoxifeno, induz a expressão da recombinase CRE exclusivamente em cardiomiócitos (Sohal et al., 2001). Já o camundongo MyD88flox apresenta o gene MyD88 flanqueado por sequências lox, sensíveis à ação da recombinase CRE. Desta forma o camundongo duplo transgênico F2 (Mer / MyD88flox+/+), após tratamento com Tamoxifeno, deve deletar, permanentemente e exclusivamente nos cardiomiócitos, o gene MyD88.

1.4 Receptor de estrógeno

Os estrógenos são hormônios que influenciam o crescimento, diferenciação, e função dos órgãos do sistema reprodutor feminino (útero, ovários e mamas), mas também atuam em tecidos não reprodutores como os sistemas cardiovasculares, ósseo e nervoso (Antonson et al., 2015). O receptor de estrógeno (RE) é uma proteína nuclear que na presença de 17 β estradiol atua como um fator de transcrição ligando-se ao DNA e estimulando a transcrição de alguns genes (Sohal et al., 2001). Dois receptores de estrógeno que desempenham esta função já foram identificados, o RE- α e o RE- β que ligados junto ao hormônio formam um complexo hormônio-receptor que se junta com outros fatores de transcrição formando o complexo de iniciação que reconhece determinadas sequências de DNA. Assim, a ativação do receptor de estrógeno induz a transcrição de genes-alvo selecionados. Além disso, a ativação do receptor de estrógeno pode cruzar com outras vias de sinalização afetando a atividade de outros fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1 (Maggi, 2012).

Os REs são compostos por 6 domínios chamados por letras (A até F) que formam as quatro regiões do complexo. A região AB que contém o sítio de ativação da transcrição e sítios de fosforilações, a região de ligação ao DNA ou domínio C, e a região D ou de dobradiça, que não é bem caracterizada. Finalmente no extremo carboxiterminal se encontra a região EF onde se liga o estradiol, região que é altamente específica para o hormônio e também tem como função a ativação da transcrição (Antonson et al., 2015 e Nieto et al., 2015).

1.5 Sistema Cre-Lox

O sistema Cre-Lox é amplamente usado, pois permite avaliar genes em qualquer lugar do corpo mediante a utilização de técnicas moleculares que possibilitam a deleção de um segmento de DNA flanqueado por sítios Lox (Rosas, 2011). Os animais MerCreMer^{+/+} possuem o gene Cre em ligação com o receptor de estrógeno humano, sendo que esse transgene se encontra sob controle do promotor da cadeia alfa da miosina cardíaca. Além disso, neste transgene ainda existe uma mutação no sítio LBD (ligand-binding domain) do RE humano (Gly521Arg) formando a proteína quimera Cre-RE^T que é ativada pelo tamoxifeno, mas não pelo estradiol (Metzger, 2001).

Os camundongos MyD88Flox^{+/+} que são cruzados com os MerCreMer^{+/+} para obter o camundongo duplamente transgênico F2 (Mer / MyD88flox^{+/+}), apresentam sítios LoxP que foram inseridos nos introns flanqueando o exon do gene MyD88. Dessa forma os dois sítios Lox marcados serão deletados pela recombinase Cre, após o tratamento com tamoxifeno, e o gene MyD88 inativado (Sohal et al., 2001).

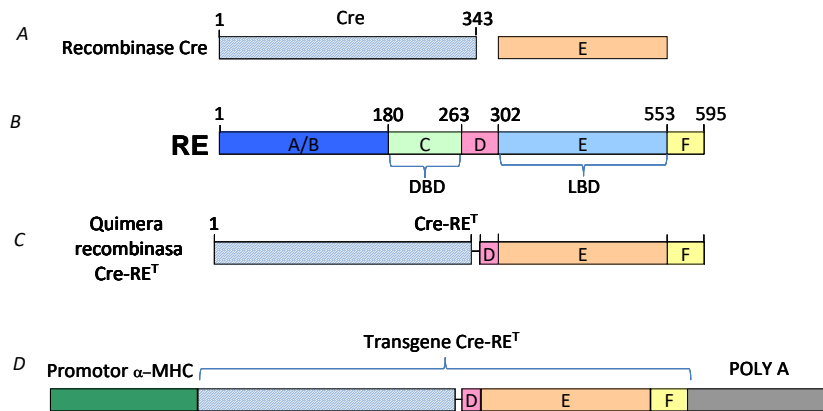


Figura 2- Representação esquemática do sistema Cre-Lox. (A) gene da recombinase Cre (B) receptor de estrógeno e seus domínios (A/B, C, D, E, F) e Sítios de ligação (DNA binding dom) e (ligand binding dom). (C) geração do transgene Cre cuja ativação é dependente de tamoxifeno. (D) controle do promotor específico para a cadeia pesada de miosina cardíaca alfa um transgene que, após tratamento com Tamoxifeno, induz a expressão da recombinase CRE exclusivamente em cardiomiócitos. (Adaptado de : Metzger 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliação do papel da molécula MyD88 na infecção dos cardiomiócitos pelo *Trypanosoma cruzi*.

2.2 Objetivos Específicos e abordagem das técnicas utilizadas

- Obtenção de uma colônia F2 (Mer / MyD88flox+/+), a partir da geração F2 resultante do cruzamento de camundongos das linhagens MyD88floxed+/+ e MerCreMer+/+.
- Análise da transcrição e expressão da molécula MyD88 no coração da progênie F2 (Mer / MyD88flox+/+) após tratamento com Tamoxifeno.
- Avaliação da infecção pelo *T. cruzi* nos animais F2 (Mer / MyD88flox+/+) tratados com tamoxifeno.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células HL1

As células HL-1 são células derivadas de músculo cardíaco, obtidas a partir da linhagem tumoral AT-1 de camundongo B6. Estas células apresentam um fenótipo semelhante ao de cardiomiócitos adultos e tem a capacidade de sofrer contrações espontâneas (Claycomb et AL., 1998).

O experimento é realizado por cultura *in vitro* de 1×10^5 células HL-1 em garrafas de 25 cm^2 contendo 5ml de meio CLAYCOMB. As culturas foram infectadas ou não com 1×10^5 formas tripomastigotas (obtidas de cultura *in vitro*) da cepa Sylvio X10/4 ou cepa Y, mantidas em estufa a 37 graus e 5% de CO_2 por 24 hr, e, após este período, as células foram destacadas das garrafas, centrifugadas e o pellet processado para análise RNA.

3.2 Extração de RNA, síntese de cDNA e amplificação por PCR do tempo real (real time)

O RNA das culturas de células HL-1 foi extraído do pellet de cada uma das amostras. No caso dos camundongos, estes foram perfundidos com PBS para eliminar o sangue dos tecidos, e o RNA extraído dos corações e baços, que foram macerados em nitrogênio líquido para evitar degradação. Todas as amostras foram processadas em $600 \mu\text{l}$ de solução buffer para isolar o mRNA. O RNA total foi obtido utilizando o Kit RNeasy Mini (Qiagen, Germantown, Maryland, USA) seguindo o protocolo do fabricante para cultura de células e tecidos animais. Um micrograma de RNA foi convertido em cDNA por incubação com transcriptase reversa (RT) de acordo com as especificações do fabricante. Após a obtenção de cDNA os transcritos de MyD88 foram quantificados por PCR do tempo real (Isohashi e Suematsu, 2006)). Se utilizou o ensaio platinum SYBR Green (Invitrogen Life Technologies) e 4 pmol/ul de “primers” específicos para o gene MyD88-380F e MyD888-480R (seqüências dos primers na

Tabela 1). A quantificação do cDNA específico para MyD88 foi realizada usando o equipamento e software ABI 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Os cálculos foram feitos por quantificação relativa, utilizando GAPDH como controle endógeno (Primers usados e as seqüências na tabela 1).

Tabela 1. Primers usados no PCR do tempo real.

Primers	Seqüência
MyD88-380F (Castoldi et al 2012)	3´-AGCCTTTACAGGTGGCCAGAG-5´
MyD888-480R(Castoldi et al 2012)	5´-AAGTTCCGGCGTTTGTCCTAG-3´
GAPDH-F (Arthur et al 2010)	3´-TGAAGCAGGCATCTGAGGG-5´
GAPDH-R (Arthur et al 2010)	5´-CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG-3´

3.3 Grupos de camundongos

Camundongos machos e fêmeas da linhagem C57Bl/6 (WT, do inglês “wild-type”), camundongos MerCreMer, Mer/MyD88flox+/+ e MyD88KO (todos em background C57Bl/6) com idade entre 6 e 16 semanas, foram mantidos no Biotério de camundongos isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura, iluminação e ventilação dentro do Biotério.

3.3.1 Obtenção da colônia de animais F2 (Mer / MyD88flox+/+)

Camundongos MerCreMer+/+ foram cruzados com camundongos MyD88flox+/+ para obter uma geração F1 (Mer+/- / MyD88flox+/-) 100% heterozigota. Estes camundongos da geração F1 foram cruzados novamente para obter a geração F2 (Mer / MyD88flox+/+) 100% homozigota para o gene MyD88flox. Para o gene MerCreMer não é possível verificar se o animal é homozigoto ou heterozigoto, uma vez que se trata de um transgene e não existe um gene WT para comparação.

Os animais parentais e as diferentes progênies foram genotipados em relação à presença dos genes MerCreMer e MyD88flox, assim como do gene MyD88 selvagem. A genotipagem foi realizada por PCR utilizando DNA extraído de sangue da cauda e pares de “primers” específicos para estes genes/transgenes.

3.4 Técnica de genotipagem (Extração de sangue dos camundongos, Técnica de PCR, e Corrida Eletroforética)

3.4.1 Extração de sangue dos camundongos

Três gotas de sangue da cauda dos camundongos foram coletadas em papel FTA CARDS que mantem o DNA em perfeito estado. O papel FTA é cortado em três discos pequenos aproximadamente de 2 mm de diâmetro e guardado em tubos ependorff de 0.2 ml (Isohashi e Suematsu, 2006) (Manzanilla-Lopez et al., 2009).

As amostras coletadas foram lavadas com reagente de purificação por duas vezes, uma vez com tris EDTA e, por ultimo, com água ultrapura, para ser posteriormente secadas na estufa por 15 minutos.

3.4.2 Técnica de PCR para genotipagem

Para amplificação de DNA foi preparado uma solução Master Mix. Os primers utilizados foram:

- a) Para amplificação do transgene MerCreMer: reverso, controle positivo interno avançado, controle positivo interno reverso, e transgene avançado (Primers usados e as seqüências na tabela 2;
- b) Para amplificação do transgene MyD88flox: MyD88floxForward, MyD88floxReverse (Primers usados e as seqüências na tabela 2) (Isohashi e Suematsu, 2006). A amplificação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (Isohashi e Suematsu, 2006).

Tabela 2. Primers usados para genotipar os animais transgênicos.

Primers	Seqüência
MerCreMer: reverso	5`-AGGTGGACCTGATCATGGAG-3`
controle positivo interno avançado	5`-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3`
controle positivo interno reverso	5`-GTAGGAGGTAATTCTAGCATCATCC-3`
transgene avançado	5`-ATACCGGAGATCATGCAAGC-3`
MyD88floxForward	5`-GTTGTGTGTGTCCGACCGT-3`
MyD88floxReverse	5`-GTCAGAAACAACCACCACCATGC-3`

3.5 Análise da expressão proteica por Western Blotting

Os corações e baços de animais F2 (Mer / MyD88flox+/+) e MerCreMer+/+ acondicionados em *freezer* -80 °C foram homogeneizados em tampão de extração (90 mM KCl, 10 mM Hepes, 3 mM MgCl²⁺, 5 mM EDTA, 1% glicerol, 1 mM DTT, 0,04% SDS, pH7,4) no Polytron (KINEMATICA POLYTRON HOMOGENIZER MIXER – PCU11), com adição de um mix de inibidores de proteases. Após centrifugação (10.000 RPM, 20 min, 4 °C), os sobrenadantes foram coletados e congelados em *freezer* -80 °C e posteriormente utilizados como amostras empregadas na técnica de Western Blotting. A concentração de proteína foi determinada pelo Método de Bradford (Bradford, 1976) e calculada segundo a equação da reta, obtida a partir da curva de concentração padrão (Albumina Sérica Bovina - BSA), sendo todas as amostras dosadas em duplicata. Após a realização de curva de quantidade de proteína, a qual se utilizou dos pontos de 25, 50 e 75 µg, a melhor concentração proteica para a proteína de interesse foi determinada. As amostras proteicas foram separadas por eletroforese (120V por 1h 30 min) em gel de 12% de SDS-Poliacrilamina (Sódio Dodecil Sulfato-Poliacrilamina), e então transferidas (120V por 1 h 30 min) para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) (concentração de componentes do gel de poliacrilamida na Tabela 2).

A membrana foi marcada com solução de Ponceau para confirmar se a concentração de proteína foi similar nos diferentes poços, assim como avaliar a

eficiência da transferência proteica do gel para a membrana. Posteriormente, a membrana foi lavada em Tampão Salina Tris Tween-20 (TBST) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 e 2% Tween-20), por 10 min, em temperatura ambiente. As membranas foram então incubadas a 4° C, *overnight* com anticorpo primário (MyD88 monoclonal) específico contra a proteína de interesse. Após lavar as membranas com TBST para remover o anticorpo primário, estas foram então incubadas por 1h, em temperatura ambiente, com o anticorpo secundário (GAPDH) ligado à peroxidase. Após a ligação do anticorpo secundário (Jackson Immuno Research), foi acrescentada uma solução de ECL (Enhanced Chemiluminescence – Thermo Fisher Scientific® inc, Waltham, MA, Estados Unidos), que, ao reagir com a peroxidase do anticorpo secundário, produziu uma reação quimioluminescente, oxidando um filme de raio-X (T-MAT G/RAFilm - KODAK) e permitindo a identificação de bandas referentes à marcação de proteínas específicas ao anticorpo primário.

A banda correspondente à proteína de interesse foi quantificada por densitometria em um sistema de fotodocumentação através do *software ImageJ*, onde a densidade ótica de cada banda foi detectada.

Tabela 3- Soluções para preparação do Gel de SDS-Poliacrilamida

Componente	Gel 12% (ml)
Água Destilada	3,3
30% Mix de Acrilamida	4,0
1.5 M Tris (pH 8,8)	2,5
10% SDS	0,1
10% Persulfato de Amônio	0,1
TEMED	0,004

Os valores expressos acima são utilizados para preparação de um Gel de 10ml.

3.6 Deleção do MyD88 no cardiomiócito: Tratamento com Tamoxifeno®

Para que o gene Cre seja induzido e clive a sequência gênica do adaptador MyD88 nos camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+) é necessário tratar os animais com tamoxifeno. O tratamento foi realizado pela via intraperitoneal utilizando 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT) (Sigma), dissolvido em etanol 100% na concentração de 100mg/ml e depois dissolvido em óleo de girassol (Sigma) na concentração de 10 mg/ml. Os animais receberam doses diárias de 20mg/kg em 50ul, por 5 dias (Hat et al., 2011 e Sohal et al., 2001)

3.7 Infecção de camundongos com *Trypanosoma cruzi*

A infecção foi realizada após o tratamento com tamoxifeno. Os camundongos dos grupos F2 (Mer / MyD88flox+/+) (grupo experimental), assim como os camundongos MerCreMer+/+, MerCreMer+/-MyD88flox-/-, C57BL/6 (grupo controle) foram infectados via intraperitoneal (i.p.), originalmente, com 1×10^3 tripomastigotas da cepa Y (parasitas obtidos de cultura in vitro em células LLCMK2 mantidas em meio RPMI suplementado com 3% de soro fetal bovino (SFB), na tentativa de padronizar a infecção. Porém, uma vez que a mortalidade foi muito alta nos grupos tratados e infectados, diminuimos a dose de infecção a 5×10^2 tripomastigotas da cepa Y.

3.7.1 Análise de histopatologia

Para o estudo histopatológico, os animais foram sacrificados usando anestésico inalante halotano 100%. Após o sacrifício, o coração, previamente perfundido, foi isolado e fixado em formol 10%. Após a fixação, o coração foi mantido em etanol 70% e em água, nas duas horas anteriores ao processamento para coloração com hematoxilina e eosina. Os órgãos obtidos de cada animal foram estabilizados em suporte próprio e preservados em parafina para realização dos posteriores cortes com espessura de 90 μ m entre cada corte. A leitura histopatológica de cada lamina foi feita a

cegas (sem conhecer o grupo de origem das lâminas) em todos os diferentes cortes dos órgãos estudados, com a finalidade de não ter influencia nos resultados obtidos.

3.8 Avaliação da presença de parasitas vivos no coração

A presença de parasitas vivos no coração foi avaliada por cultura em meio LIT de alíquotas contendo 0.1 e 0.01 mg de homogeneizado deste órgão. Para evitar a contaminação do coração com sangue, os animais foram perfundidos com tampão fosfato salino (PBS) injetado no ventrículo direito com uma bomba peristáltica Pump Pro TPM (Watson-Marlow Inc., Massachusetts, USA) com a veia cava inferior seccionada.

A estimativa de carga parasitária no meio LIT foi feita pelo numero de culturas e animais que positivaram.

3.9 Análise estatística

Utilizou-se Two-way ANOVA, T Test, seguido do Teste de Bonferroni, e o teste log-rank (Mantel Cox) do programa Prisma 5 (Graph Pad Software, La Jolla, Califórnia, USA) para analisar os dados obtidos e comparar os grupos experimentais. A utilização estatística foi feita de acordo com cada situação como descrito nas legendas das figuras. Para reconhecer a significância estatística entre os diferentes grupos obtivesse uma media +/- desvio padrão da amostra (media +/-). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação “in vitro” da expressão gênica da molécula MyD88 em cardiomiócitos HL-1 após a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Acredita-se que a molécula MyD88 seja importante no reconhecimento direto do *Trypanosoma cruzi* por cardiomiócitos infectados. De fato, em experiências anteriores realizadas em diversos laboratórios, incluído o nosso, foi observado um comprometimento cardíaco diferente em animais MyD88KO e B6 infectados (Henao, 2012). Mais importante, uma produção diferente de citocinas/quimiocinas foi observada em resposta ao *T. cruzi* nas culturas de cardiomiócitos (isolados de camundongos recém-nascidos) deficientes em diferentes moléculas TLRs (“Toll-like receptors”) quando comparada à de culturas de cardiomiócitos de camundongos B6 (Machado et al., 2000). Contudo, não há como ter certeza que os efeitos observados decorram do envolvimento da molécula MyD88 nos cardiomiócitos, uma vez que no coração há outros tipos celulares, tais como fibroblastos, células endoteliais e células residentes da imunidade inata, e, ainda, porque uma pequena contaminação por fibroblastos parece ser comum nas culturas de cardiomiócitos de neonato. Desta forma, é importante realizarmos uma avaliação onde seja testada a presença de MyD88 em uma população exclusivamente formada por cardiomiócitos.

Esta avaliação foi realizada utilizando células HL-1, uma linhagem tumoral de cardiomiócitos, obtida de camundongos B6, que mantida no meio CLAYCOMB mantém grande parte das funções desta população cardíaca (Claycomb et al., 1998). Como descrito nos materiais e métodos, células HL-1 foram infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* das cepas Sylvio X10/4 ou Y, ou deixadas sem infectar, e após 24 h de cultura a 37 graus, lavadas e centrifugadas, procedendo-se a extração de RNA nos pellets das culturas. Após a transcrição reversa destes para cDNA foi realizado PCR para o gene MyD88.

Expressão (PCR) de MyD88

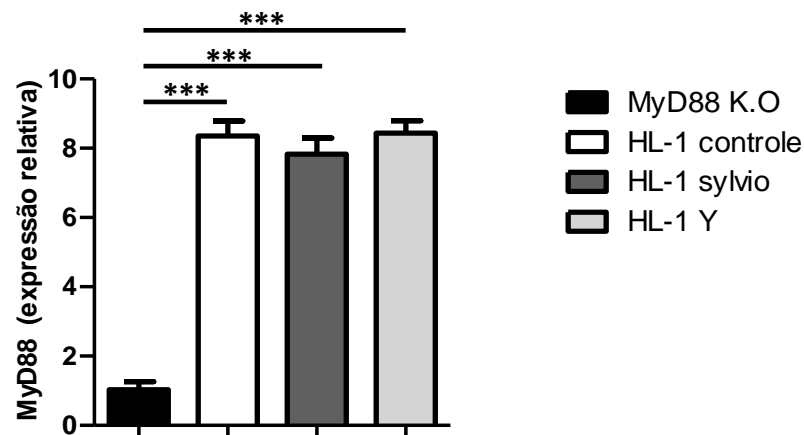


Figura 3- Expressão gênica de MyD88 em coração e células HL-1. Células HL-1 infectadas por 24 horas com tripomastigotas das cepas Sylvio X10/4 e Y de *Trypanosoma cruzi*. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, T test, Two-way ANOVA. $n = 2$ MyD88 K.O. $n = 3$ por grupo HL-1. Número de repetições de experimento 2.

Os resultados da **Fig. 3** mostram que as células HL-1 (grupo controle e infectadas com as cepas do *T. cruzi*) comparadas com coração de animais MyD88KO apresentam uma quantidade maior dos transcritos de MyD88, resultado que fortemente sugere a presença desta molécula nesta população de cardiomiócitos. Contudo, uma vez que HL-1 é uma célula tumoral, os resultados não podem ser simplesmente aplicados aos cardiomiócitos do animal adulto, conclusão que nos obriga a retornar aos experimentos “in vivo”.

4.2 Avaliação “in vitro” da expressão protéica da molécula MyD88 em cardiomiócitos HL-1 após a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Uma vez demonstrada a expressão gênica de MyD88 nas células HL-1 nos também avaliamos a sua expressão proteica, comparada à do coração de animais MyD88KO. Foram usados três grupos de células HL-1 (um grupo infectado com *T. cruzi* Sylvio X10/4, outro infectado com *T. cruzi* Y, e outro grupo, sem infectar, como grupo controle). A molécula GAPDH foi usada como normalizador, determinando assim a quantidade de proteína colocada em cada grupo.



Expressão proteica de MyD88 no coração

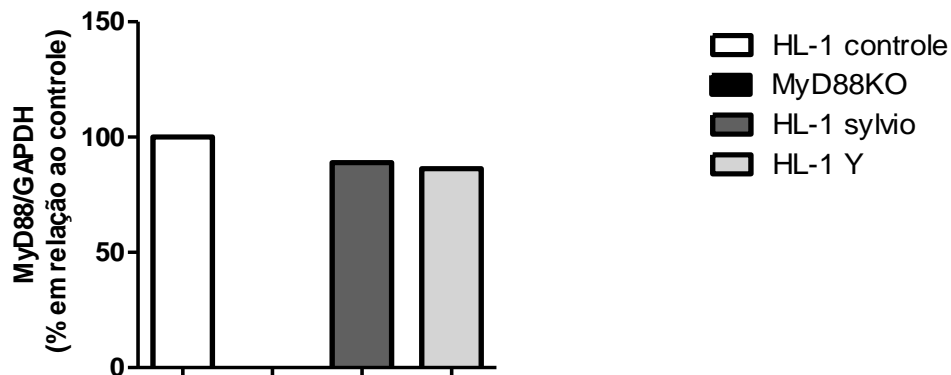


Figura 4- Análise da expressão protéica de MyD88 por Western Blotting. Coração de camundongos MyD88KO e células HL-1 não infectadas ou infectadas por 24 horas com tripomastigotas das cepas Sylvio X10/4 e Y de *Trypanosoma cruzi*. n=2 MyD88KO. n= pool composto por três amostras de cada grupo HL-1.

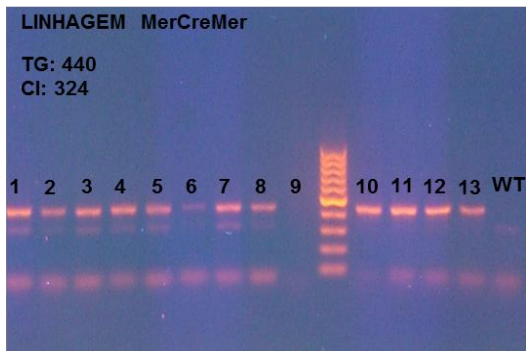
O resultado mostra que os três grupos de células HL-1 estão expressando a proteína MyD88 em relação com o grupo controle negativo MyD88KO. Este resultado confirma a presença desta molécula nas células HL-1 e sugere que os cardiomiócitos devem também apresentar MyD88 em sua estrutura, apoiando a realização de experimentos *in vivo*.

4.3 Obtenção dos animais duplamente transgênicos F2 (Mer / MyD88flo^x +/+)

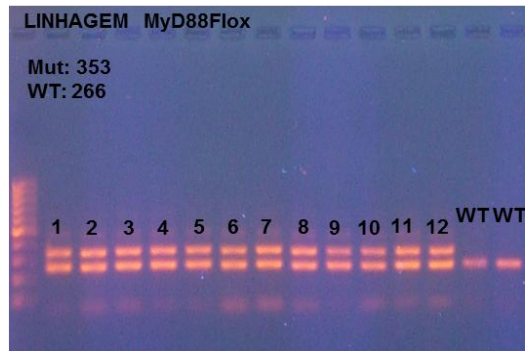
Para continuar com experimentos “*in vivo*” é preciso utilizar animais nos quais a molécula MyD88 esteja seletivamente ausente nos cardiomiócitos. Ainda, uma vez que MyD88 é uma molécula adaptadora envolvida na via de sinalização de moléculas TLRs, IL-1 e IL-18, e como as moléculas TLRs também são sinalizadas por DAMPS (“damage-associated molecular patterns”) achamos conveniente optar por uma eliminação seletiva da molécula MyD88 no adulto. Desta forma, utilizamos o sistema CRE-LOX (camundongos duplo-transgênicos MerCreMer/MyD88flo^x+/+, descritos na introdução) onde a molécula MyD88 é eliminada seletivamente dos cardiomiócitos após o tratamento com tamoxifeno.

A

Genotipagem do gene MerCreMer

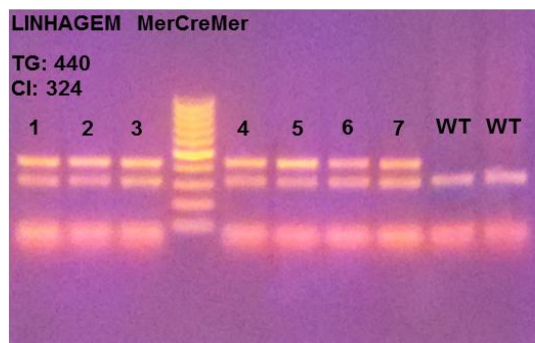


Genotipagem do gene MyD88Flo^x



B

Genotipagem do gene MerCreMer



Genotipagem do gene MyD88Flo^x

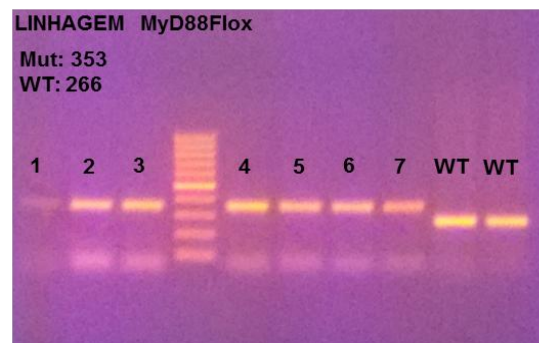


Figura 5- Genotipagem dos camundongos do grupo experimental. (A) Camundongos F1 (Mer^{+/-} / MyD88flox^{+/-}) obtidos do cruzamento de MerCreMer e MyD88flox. (B) Camundongos F2 (Mer / MyD88flox^{+/+}). Em A e B foram incluídas amostras WT como controle negativo, indicando a presença do gene selvagem.

Para a obtenção destes animais foi necessário o cruzamento das linhagens MerCreMer^{+/+} e MyD88flox^{+/+} para gerar uma progênie F1 de animais heterozigotos para ambos genes. Após cruzamentos destes animais F1 obteve-se uma progênie geneticamente variada de camundongos F2, da qual escolhemos por genotipagem aqueles com genótipo Mer / MyD88flox^{+/+}, que novamente cruzados entre si geraram os animais da progênie F3, que denominamos F2 (Mer / MyD88flox^{+/+}). Pode-se observar claramente que os animais F2 são homozigotos para o gene MyD88flox, o que não é possível determinar em relação ao gene MerCreMer por ser este um transgene.

Todos os animais utilizados nas experiências foram genotipados. Os animais homozigotos para MyD88flox são caracterizados pela presença da banda mutante de 353 pb, mas não apresentam a banda WT de 266 pb (**Fig. 5 B**), enquanto que a banda transgênica 440 pb presente no linhagem MerCreMer não permite diferenciar entre animais heterozigotos e homozigotos.

4.3.1 Avaliação do tratamento com tamoxifeno na expressão gênica de MyD88 no coração dos animais duplamente transgênicos F2 (Mer / MyD88flox^{+/+})

Para avaliar o efeito do tratamento com tamoxifeno sobre a transcrição de MyD88 no coração (e/ou baço), animais WT/MyD88flox^{+/-} e F2 (Mer / MyD88flox^{+/+}) (experimentos das figuras 5A e 5B), assim como animais MerCreMer^{+/+}, F2 (Mer / MyD88flox^{+/+}), C57BL/6 e MyD88KO (experimento da figura 5C), foram todos inoculados pela via intra-peritoneal com tamoxifeno, dissolvido em etanol 100% na concentração de 100mg/ml e depois em óleo de girassol a 10mg/ml. Os camundongos receberam doses diárias (20mg/kg em 50 ul) durante cinco dias (Hall et al., 2011 e Sohal et al., 2001). Após 24 dias (animais das figuras 6A e 6B) ou 57 dias (animais das figuras 6C) de finalizado o tratamento com a droga, os animais foram sacrificados e a expressão de MyD88 no coração, ou no baço, estimada através de PCR. (NOTA: denominamos animais WT / MyD88flox^{+/-} aqueles resultantes do cruzamento de

animais F1, que na genotipagem se mostraram negativos para MerCreMer e negativos ou heterozigotos para MyD88flox).

Nas **Figuras 6A e 6B**, que mostram respectivamente a transcrição de MyD88 no coração e baço dos camundongos WT/MyD88flox+/- e F2 (Mer / MyD88flox+/+), pode se observar que houve deleção do gene MyD88 no coração dos animais F2 (Mer / MyD88flox+/+), mais não no baço. Na **Figura 6C** pode-se novamente observar a transcrição diminuída de MyD88 no coração de animais F2

(Mer / MyD88flox+/+), desta vez comparada à de animais MerCreMer+/+ igualmente tratados.

Na mesma **Figura 6C**, a transcrição de MyD88 no coração de camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+) e MerCreMer foi comparada à de camundongos MyD88KO e C57Bl/6, que representam respectivamente os controles negativo e positivo de transcrição deste adaptador. Os resultados deste experimento confirmam a adequação do modelo no sistema CreLox para a eliminação de MyD88 do coração uma vez que os animais F2 (Mer / MyD88flox+/+) tratados com tamoxifeno mostraram neste órgão níveis similares do adaptador que os animais MyD88KO. Além de validar o modelo, estes resultados indicam que no coração do animal não infectado pelo *T. cruzi* a expressão basal do MyD88 deve ser atribuída principalmente à sua transcrição pelos cardiomiócitos, uma vez que no camundongo F2 (Mer / MyD88flox+/+) tratado o nível de transcritos de MyD88 não é superior aos dos camundongos MyD88KO, que carecem desta molécula em todas as populações celulares.

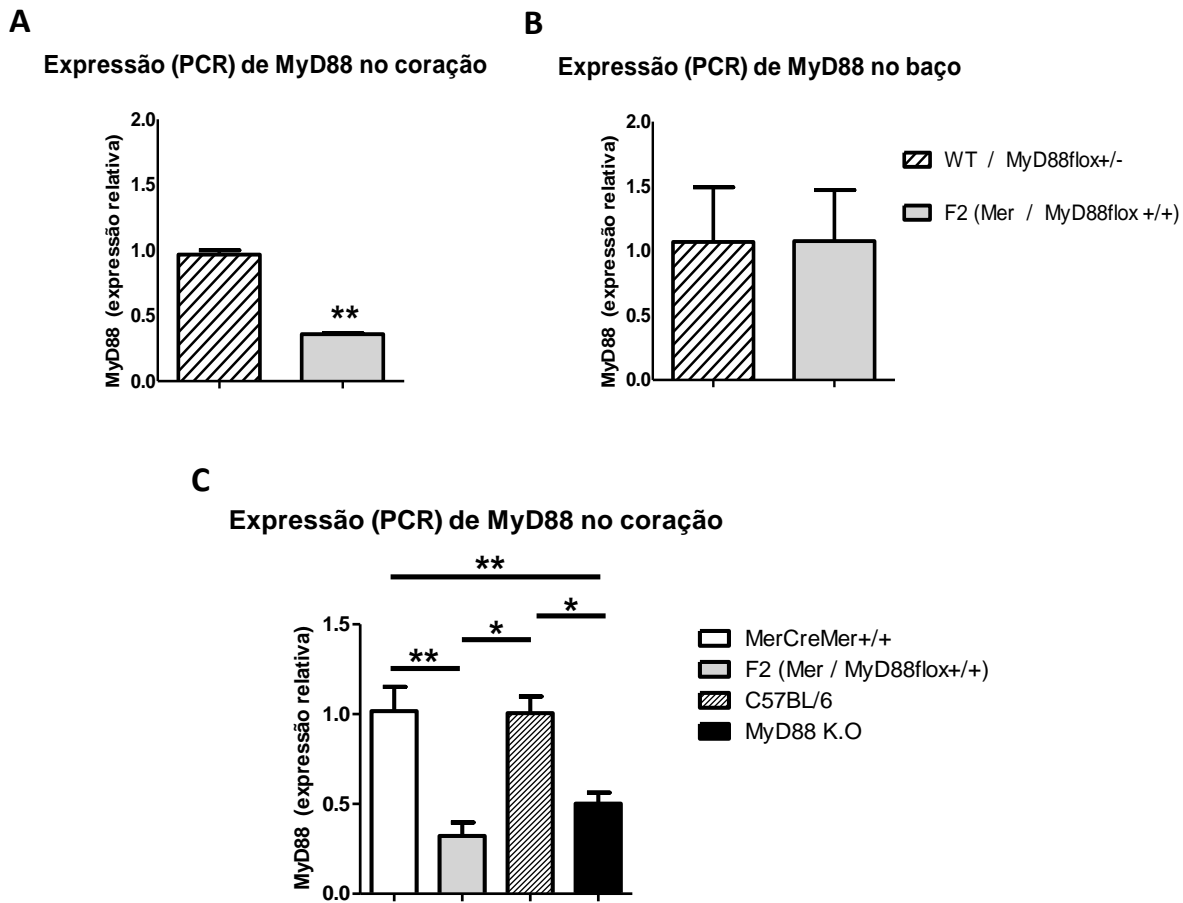


Figura 6- Expressão gênica (PCR) de MyD88 após tratamento com tamoxifeno. Análise dos resultados obtidos do PCR em Tempo Real sobre a transcrição de MyD88 no coração Figura (A) e baço (B) de animais F2 (Mer / MyD88flo^{+/+}) tratados com tamoxifeno, comparada à de animais WT / MyD88^{+/-}. (C) Análise dos resultados do PCR da transcrição da molécula MyD88 no coração de animais MerCreMer^{+/+} tratados com tamoxifeno, C57BL/6, e MyD88KO, em relação à dos camundongos F2 (Mer / MyD88flo^{+/+}) tratados com tamoxifeno. **p<0,01, *p<0,05, T test, Two-way ANOVA. (A) e (B) n= 3 camundongos machos. (C) n= 3 camundongos fêmeas para os grupos MerCreMer^{+/+} e F2 (Mer / MyD88flo^{+/+}), e 2 camundongos machos para os grupos C57BL/6 e MyD88KO.

A expressão gênica de MyD88 no coração foi também comparada em animais não infectados das linhagens C57BL/6 e F2 (Mer / MyD88flo^{+/+}), estes últimos tratados com tamoxifeno, comparada à destes mesmos grupos às quatro semanas da infecção pelo *T. cruzi*. Nas **Figuras 7A e 7B** podemos observar que a expressão de MyD88 no coração dos camundongos infectados aumenta sensivelmente em relação à dos camundongos não infectados, o que pode ser explicado não somente por aumento na

expressão de MyD88 nos próprios cardiomiócitos, mas principalmente pela intensa expressão desta molécula nas células inflamatórias do infiltrado cardíaco.

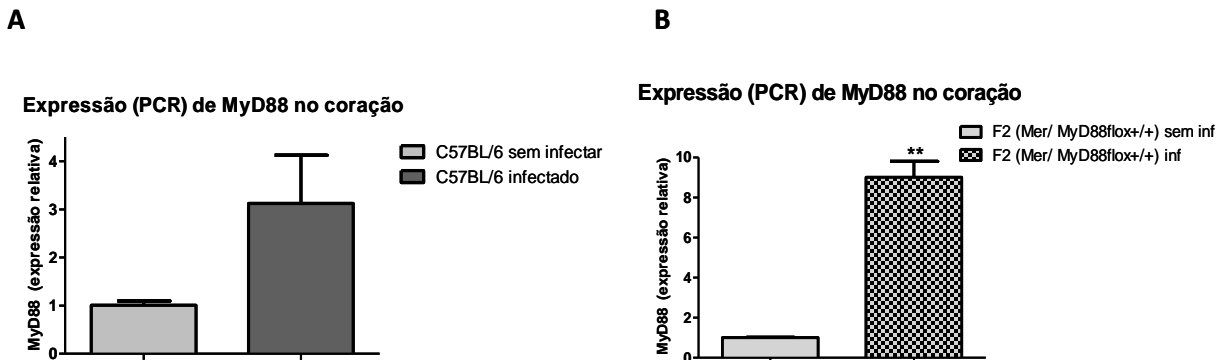


Figura 7- Expressão gênica (PCR) de MyD88 no coração de camundongos C57BL/6 não tratados com tamoxifeno e camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+) tratados com tamoxifeno, infectados pelo *T. cruzi* ou não infectados. (A) Animais C57BL/6. (B) Animais F2 (Mer / MyD88flox+/+). ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, T test, Two-way ANOVA. (A) $n = 2$ camundongos machos. (B) $n = 2$ camundongos fêmeas. Numero de repetições 2 para cada experimento.

A expressão de MyD88 foi também avaliada em forma separada no ventrículo e átrio (aurícula) de camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+) e MerCreMer+/+ tratados com tamoxifeno, mas não infectados. Com este objetivo, no momento da extração, o coração dos camundongos citados foi seccionado grosseiramente por um corte transversal, na tentativa de obter a maior quantidade possível de átrio do ventrículo separados.

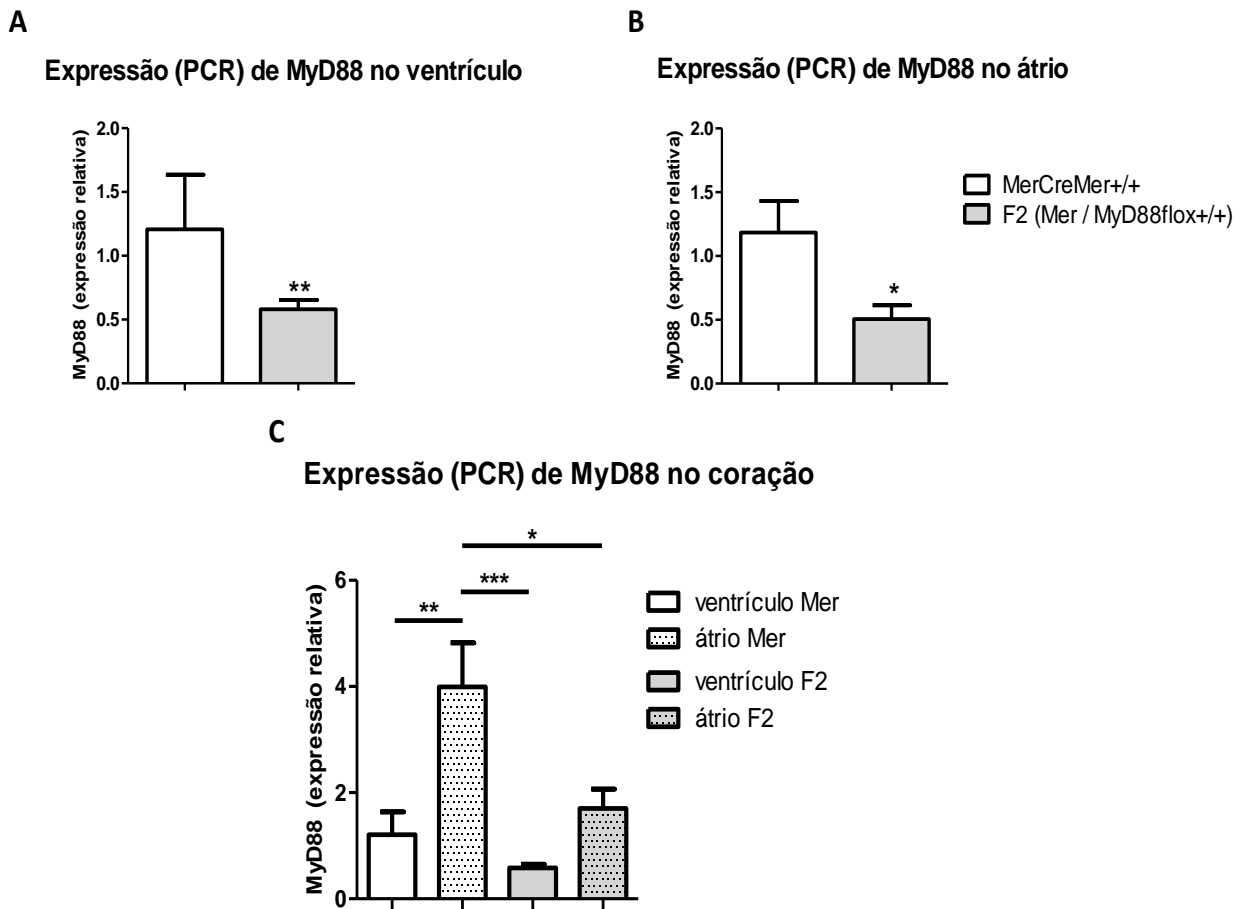
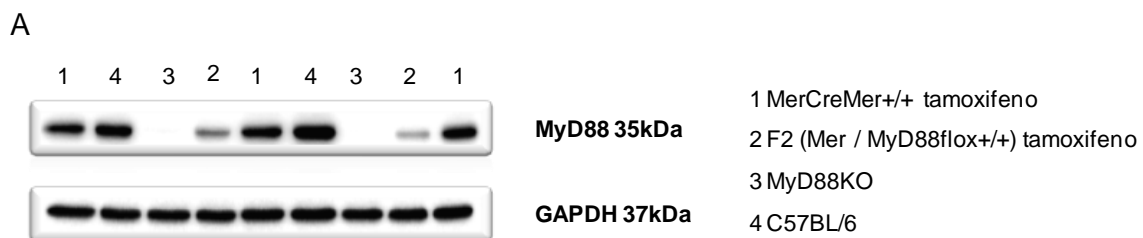


Figura 8- Expressão (PCR) de MyD88 em átrio e ventrículo de camundongos MerCreMer+/+ comparados com camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+). (A) Ventrículo. (B) Átrio. (C, D) Comparação de átrios e ventrículos. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, T test, Two-way ANOVA. $n = 6$ camundongos machos para cada grupo.

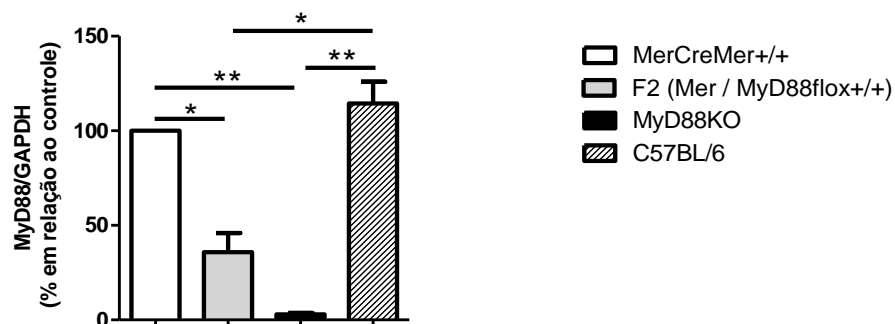
Quando avaliados separadamente, tanto o ventrículo como o átrio, mostraram diferenças significativas entre os camundongos MerCreMer+/+ e camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+), ambos tratados com tamoxifeno, na expressão de MyD88 (**Fig. 8A**) e (**Fig. 8B**). Ainda, quando comparadas na mesma figura a expressão de MyD88 nos ventrículos e átrios de ambos os grupos de animais, observamos que nos animais MerCreMer a quantidade de transcritos para MyD88 é significativamente maior no átrio do que no ventrículo. Uma tendência a uma maior expressão de MyD88 foi também observada quando a expressão desta molécula no átrio do camundongo F2 (Mer / MyD88flox+/+) foi comparada à do ventrículo nestes mesmos animais.

4.3.2 Avaliação do tratamento com tamoxifeno na expressão proteica de MyD88 no coração dos animais duplamente transgênicos F2 (Mer / MyD88flox +/+)

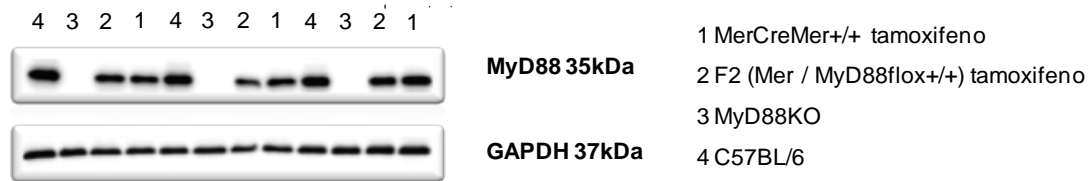
Para confirmar que os camundongos F2 (Mer / MyD88+/+) tratados com tamoxifeno deletam a molécula MyD88 exclusivamente nos cardiomiócitos, além de avaliar a expressão do gene nos corações de camundongos tratados, também avaliamos a expressão proteica. Como órgão controle foi usado o baço, mostrando assim que a deleção da molécula alvo foi feita unicamente nos corações (cardiomiócitos). O GAPDH foi usado como normalizador, indicando a presença de proteína em todas as amostras.



Expressão proteica de MyD88 no coração



B



Expressão proteica de MyD88 no baço

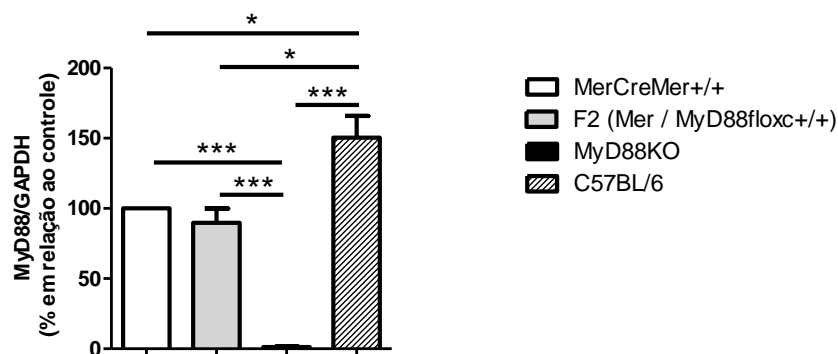


Figura 9- Análise da expressão proteica de MyD88 por Western Blotting. Camundongos do grupo experimental F2 (MerCreMer / MyD88+/+) e do grupo controle MerCreMer+/+ foram tratados com tamoxifeno. Os outros dois controles (MyD88KO e C57BL/6) não foram tratados com tamoxifeno. (A) Expressão protéica de MyD88, comparada com a expressão protéica do GAPDH no coração. (B) Expressão protéica de MyD88, comparada com a expressão protéica do GAPDH no baço. **p<0,01, *p<0,05, T test, Two-way ANOVA. n=3 camundongos machos para cada grupo. Somente para teu conhecimento: Existe a possibilidade do tamoxifeno estar inibindo a transcrição de MyD88 em forma inespecífica (é corticoide e por tanto, imunossupressor)

Os resultados indicam que além da deleção gênica da molécula MyD88 nos cardiomiócitos de camundongos F2 (Mer / MyD88+/+) tratados com tamoxifeno, mas não infectados, também houve queda dos níveis de proteína no coração destes mesmos animais, confirmando a idoneidade do modelo utilizado.

4.3.3 Avaliação da parasitemia em animais C57BL6 infectados após tratamento com tamoxifeno

Para verificar os efeitos do tamoxifeno na parasitemia, realizou-se um experimento com animais C57BL/6 (fêmeas) inoculados com tamoxifeno durante cinco dias com a dose estipulada e separados em quatro grupos. O primeiro grupo (Tratamento A) foi tratado na primeira semana, o segundo grupo (Tratamento B) foi tratado na segunda semana, o terceiro grupo (Tratamento C) foi tratado na terceira semana, e o quarto grupo (grupo controle) não foi tratado com esta droga. Na quarta semana os animais de todos os grupos foram infectados com 10^3 parasitas e as parasitemias avaliadas do dia 5 p.i. até o dia 17 p.i.

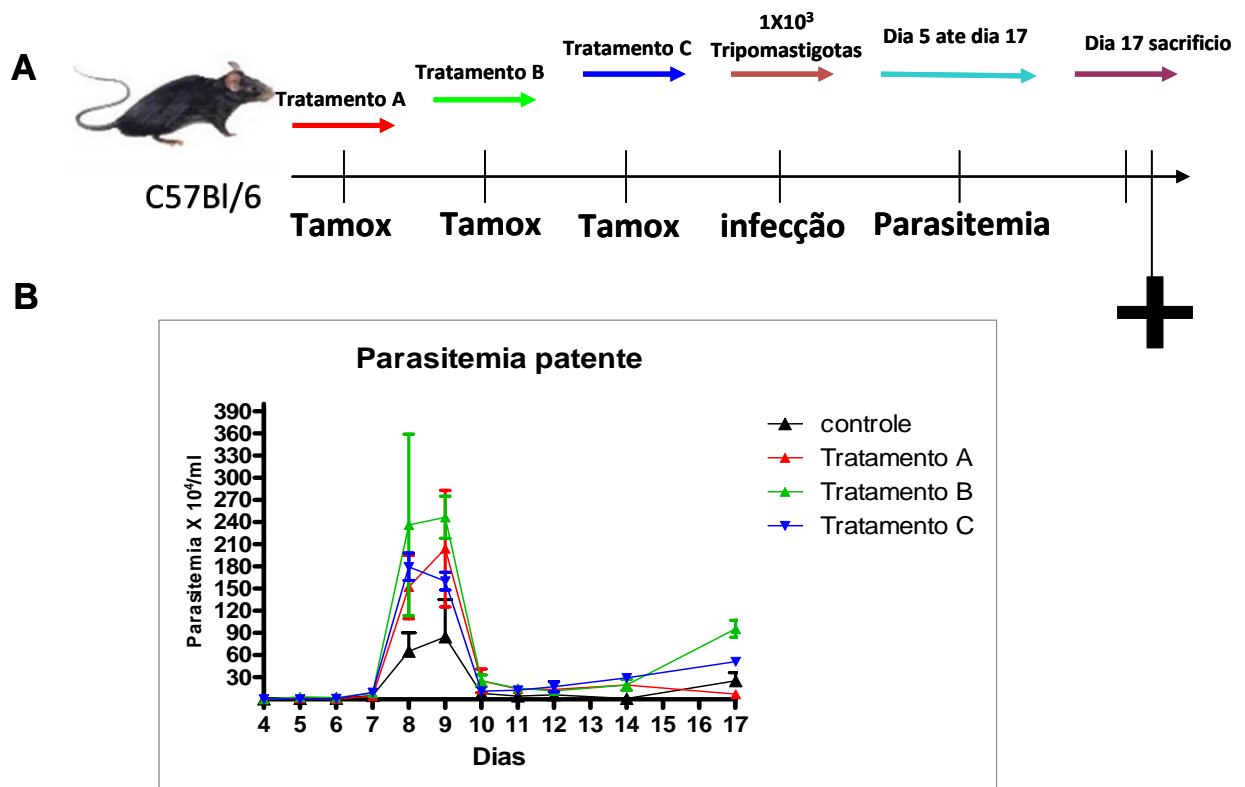


Figura 10- Curvas de parasitemia dos animais tratados com tamoxifeno e infectados com 10^3 parasitas via Intraperitoneal (i.p.), uma ou três semanas mais tarde. Os tratamentos realizados foram: Tratamento A (três semanas antes da infecção), Tratamento B (duas semanas antes da infecção), e o Tratamento C (uma semana antes da infecção). (A) linha do tempo do experimento. (B) Parasitemia dos grupos experimentais, do dia 5 até o dia 17. Os resultados não tiveram significância estatística. $n = 2$ camundongos C57/BL6 fêmeas para cada grupo.

O resultado mostrado na **Fig. 10 A** indica diferenças não significativas (provavelmente por conta do baixo n) nos grupos tratados com tamoxifeno, principalmente no primeiro pico, mas também no segundo, em relação àqueles no grupo controle não tratado. Contudo, os camundongos tratados do **Tratamento A** apresentaram uma parasitemia mais controlada do segundo pico, se comparado à dos grupos dos tratamentos (**B** e **C**) e tendo como referência o grupo controle. Em face destes resultados e visando escolher uma data ideal para o momento de infecção em futuros ensaios, concluímos provisoriamente que a infecção deveria ser realizada às quatro ou mais semanas do término de tratamento com tamoxifeno.

O resultado anterior mostrou que após o tratamento com tamoxifeno a curva de parasitemia é modificada. Entretanto, cogitamos se este efeito poderia ser devido ao óleo de girassol utilizado na solubilização do tamoxifeno. Para esclarecer esta questão realizamos um experimento com animais C57BL/6 distribuídos em quatro grupos: um grupo controle sem tratamento, um grupo tratado com óleo de girassol e dois grupos tratados com tamoxifeno (**A**) ou (**C**).

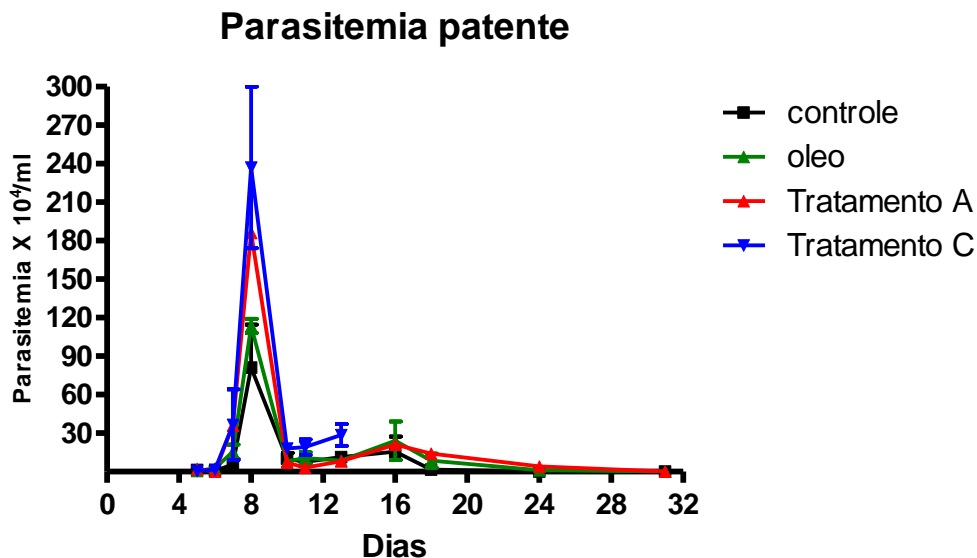


Figura 11- Parasitemia patente dos animais tratados com tamoxifeno ou óleo de girassol e infectados com 10^3 parasitas. Os tratamentos realizados foram: Controle (sem tratamento), Óleo (Tratados com óleo uma semana antes da infecção), Tratamento A (Tratados com tamoxifeno três semanas antes da infecção), Tratamento C (Tratados com tamoxifeno uma semana antes da infecção). Parasitemia dos grupos experimentais, do dia 5 até o dia 32. Os

resultados não tiveram significância estatística. n= 2 camundongos C57/BL6 machos para cada grupo.

Neste experimento observamos que os animais tratados com óleo de girassol apresentaram uma curva de parasitemia similar à do grupo controle (**Fig. 11**). Ainda, confirmamos o efeito do tamoxifeno aumentando o primeiro pico de parasitemia. Já em relação ao segundo pico, o experimento não foi conclusivo já que a totalidade dos animais tratados com tamoxifeno (**tratamento C**) veio falecer. O conjunto dos experimentos realizado nos levou a concluir que a infecção pelo *T. cruzi* deveria ser realizada às quatro ou mais semanas de finalizado o tratamento. Mais importante, para uma análise confiável o grupo experimental F2 (Mer / MyD88flox+/+) tratado com tamoxifeno deveria ser sempre comparado ao grupo MerCreMer+/+ similarmente tratado.

4.3.4 Importância da molécula MyD88 do coração na parasitemia e na sobrevivência de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*.

Para avaliar se a ausência da molécula MyD88 nos cardiomiócitos teria algum efeito no controle dos parasitas na corrente sanguínea, comparamos as curvas de parasitemia dos animais do grupo controle MerCreMer+/+ (**Fig. 12 A**) e experimental F2 (Mer / MyD88flox+/+), todos eles tratados com tamoxifeno e infectados após 4 semanas de terminado o tratamento. Neste experimento a parasitemia foi avaliada do dia 5 p.i. ao dia 21 p.i.. Além disso nos avaliamos no mesmo experimento o porcentagem de sobrevivência tanto nos animais F2 (Mer / MyD88flox+/+) como nos animais MerCreMer+/+ (**Fig. 12 B**).

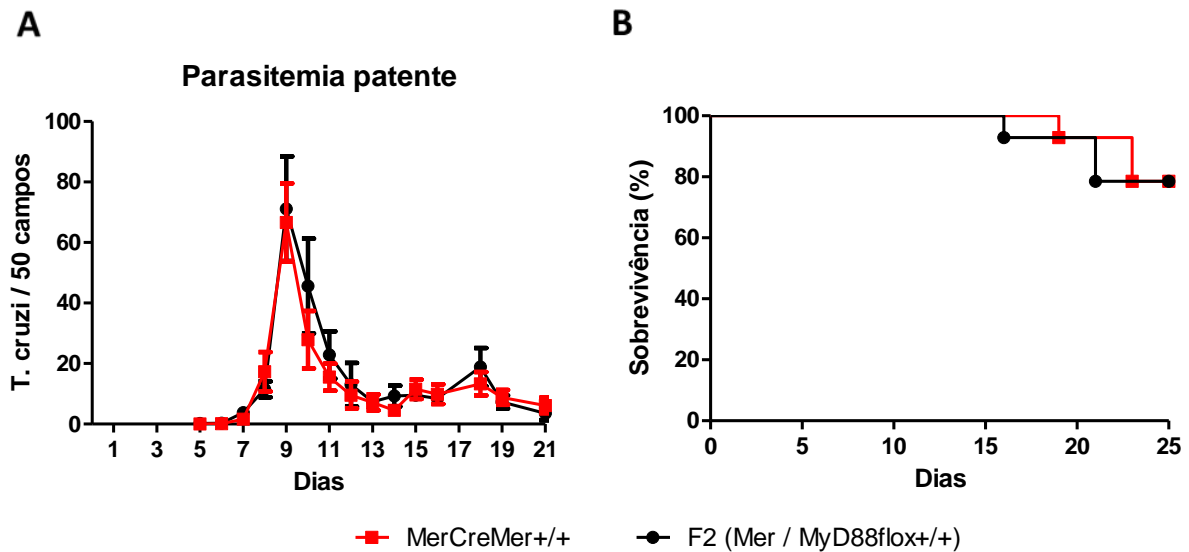


Figura 12- Análise de parasitemia patente (figura A) e porcentagem de sobrevivência (Figura B) em camundongos infectados com *T. cruzi*. Camundongos MerCreMer+/+ e F2 (Mer / MyD88flox+/+) foram tratados com tamoxifeno durante cinco dias e após 4 semanas do tratamento foram infectados com 5×10^2 parasitas. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, Two-way ANOVA. $n = 14$ camundongos machos por grupo. Numero de repetições = 3.

O experimento (**Fig. 12**) não exibe diferença significativa entre os grupos. Este experimento foi realizado com a finalidade de aumentar o (n), de forma a diminuir o desvio notado em experimentos anteriores. Como pode ser claramente observado, em ambos grupos a parasitemia exibe dois picos, o mais elevado no dia 9, e o menor no dia 18. Globalmente, podemos concluir que a eliminação do gene MyD88 dos cardiomiócitos não altera significativamente a quantidade de parasitas na corrente sanguínea e da mesma forma não altera o porcentagem de sobrevivência na infecção (em relação aos animais MerCreMer similarmente tratados).

4.3.5 Análise da carga parasitaria do coração nos camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+) e MerCreMer+/+ tratados com tamoxifeno e infectados com *Trypanosoma cruzi* da cepa Y

Já em relação á carga parasitária no coração dos camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+) e MerCreMer+/+, tratados com tamoxifeno e infectados com 5×10^2 parasitas da cepa Y, esta foi estimada após sacrificio, no dia 13 p.i., através das culturas em meio LIT com alíquotas do macerado do coração, não sendo observadas diferenças significativas nos dois grupos avaliados. Este resultado mostra que, na referido momento após a infecção, a carga parasitária cardíaca dos animais F2 (Mer / MyD88flox+/+) tratados com tamoxifeno (e, por tanto, com deleção da molécula MyD88 exclusivamente nos cardiomiócitos) não difere daquela nos camundongos do grupo controle MerCreMer+/+ igualmente tratado.

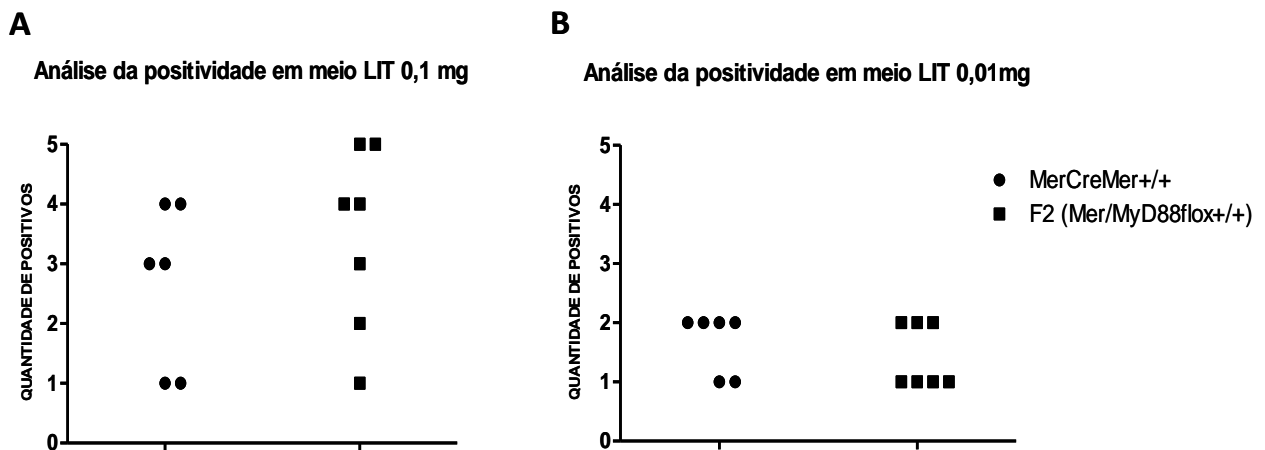


Figura 13- Carga parasitaria no coração de camundongos MerCreMer+/+ e F2 (Mer / MyD88flox+/+). tratados com tamoxifeno e infectados com 5×10^2 parasitas via i.p.. A carga parasitaria foi estimada pela positividade das culturas em meio LIT com alíquotas de 0,1 mg (A) e 0,01mg (B) do macerado do órgão. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, T test. $n = 7$ camundongos machos para cada grupo. Os resultados não exibem diferença significativa.

4.3.6 Avaliação histopatológica do coração nos camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+) e MerCreMer+/+ tratados com tamoxifeno e infectados com *Trypanosoma cruzi* da cepa Y por 10 dias.

Este primeiro experimento foi realizado com a finalidade de avaliar o grau de comprometimento cardíaco nos camundongos que apresentam deleção seletiva de MyD88 nos cardiomiócitos, em um momento da infecção onde as alterações histopatológicas do coração estão começando a se observar. Camundongos MerCreMer+/+ e F2 (Mer / MyD88flox+/+) foram tratados com tamoxifeno por 5 dias e, 4 semanas mais tarde, infectados pelo *T. cruzi*. No dia 10 p.i., os animais infectados e aqueles dos grupos controle não infectados foram sacrificados e, após perfusão, o coração foi pesado, o que não revelou diferenças significativas entre os grupos (**Fig. 14**), e procesado para avaliação histopatológica após emblocamento em parafina.

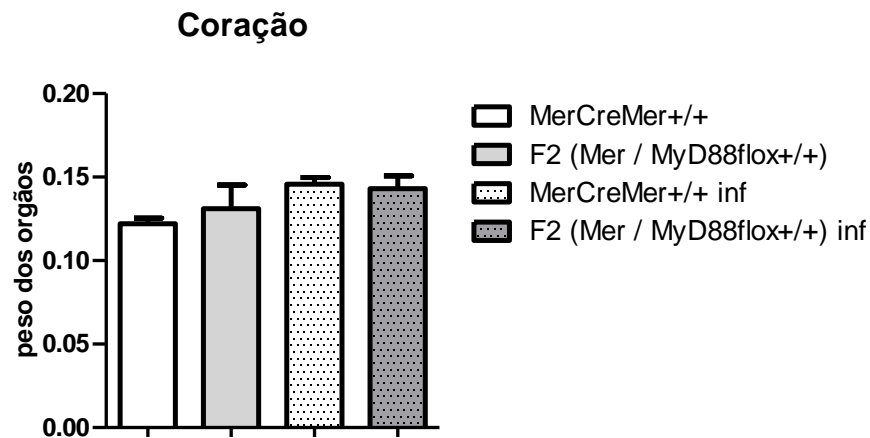


Figura 14- Peso do coração dos animais tratados com tamoxifeno. Grupos controle MerCreMer+/+ e F2 (Mer / MyD88flox+/+) sem infectar e grupos experimentais MerCreMer+/+ e F2 (Mer / MyD88flox+/+) infectados por 10 dias com 5×10^2 parasitas via i.p.. [n= 4 camundongos fêmeas para MerCreMer+/+ e 3 camundongos fêmeas F2 (Mer / MyD88flox+/+)]. O resultado não mostrou diferença significativa.

Vários cortes de tecido cardíaco de cada animal foram analisados, estimando-se em cada um deles o número de ninhos de amastigotas, assim como a intensidade da endocardite, pericardite e miocardite, no ventrículo e átrio. Especificamente consideramos que, nesta primeira experiência, a avaliação foi incompleta, não somente em função do “n” ter sido pequeno, mas também porque no exame histopatológico não

foi possível obtermos os átrios de todos os animais, inviabilizando derivar conclusões sobre esta região do coração.

Contudo, observamos que a média do número de ninhos por lâmina no ventrículo foi pequena e não diferente entre os grupos MerCreMer+/+ e F2 (Mer / MyD88flox+/+) (**Fig. 15 A**). Já na aurícula o número médio de ninhos por lâmina foi bem maior, mas, como antecipado acima, no processamento do coração perdemos a aurícula de 3 dos 4 animais MerCreMer+/+, impossibilitando um estudo comparativo entre os dois grupos (**Fig. 15 B**).

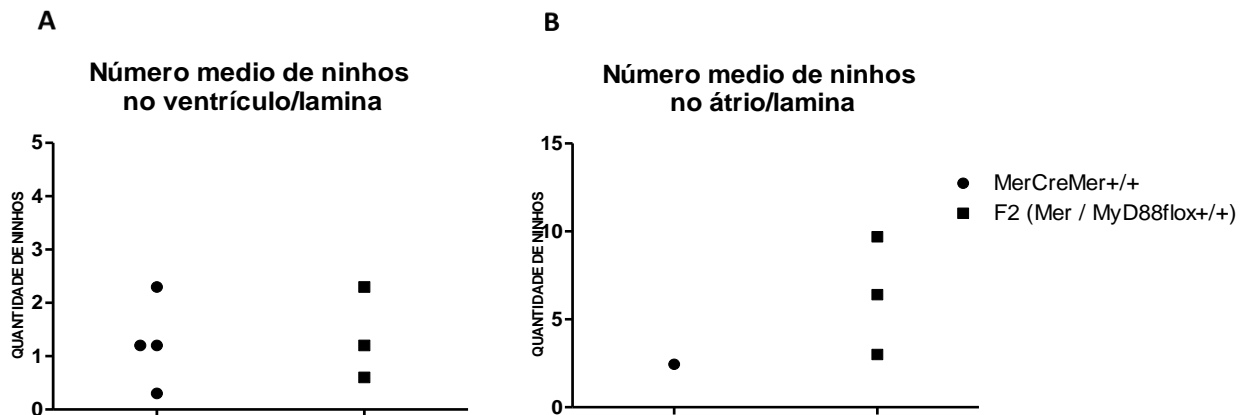


Figura 15- Número de ninhos no coração de animais MerCreMer+/+ e F2 (Mer / MyD88flox+/+) Tratados com tamoxifeno e infectados com 5×10^2 parasitas i.p.. (A) Análise histopatológico no ventrículo. (B) Análise histopatológico do atrio. Para cada um dos órgãos dos animais foram realizados 10 cortes com espaços entre corte e corte de 90 μ m. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. n= 4 camundongos fêmeas para MerCreMer+/+. n=3 camundongos fêmeas F2 (Mer / MyD88flox+/+).

Já que os dados dos animais F2 (Mer / MyD88flox+/+) estão completos, na **Fig. 16** mostramos que no dia 10 p.i. o número de ninhos é significativamente maior no átrio do que no ventrículo, sugerindo que no início da infecção pelo *T. cruzi* da cepa Y a aurícula é mais facilmente invadida pelo parasita.

Numero de ninhos no coração

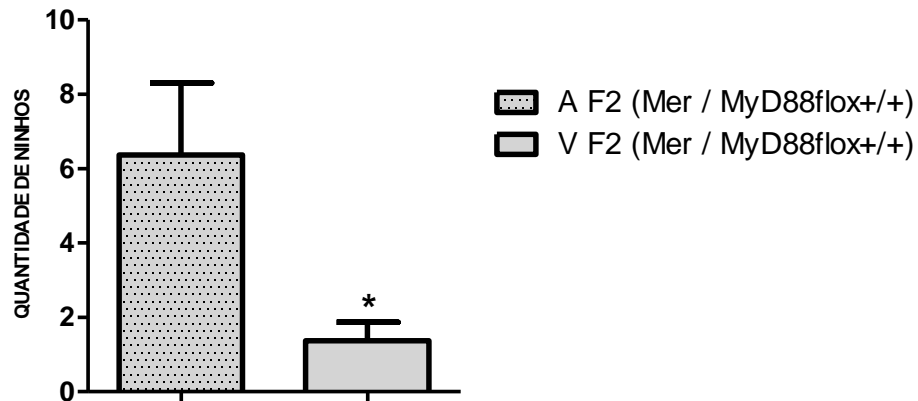


Figura 16- Número de ninhos no átrio e ventrículo dos animais F2 (Mer / MyD88flox+/+). Tratados com tamoxifeno e infectados com 5×10^2 parasitas i.p. e sacrificados no dia 10 após infecção. Para cada um dos órgãos dos animais foram realizados 10 cortes com espaços entre corte e corte de 90 μ m. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, T test. n=4 camundongos fêmeas para MerCreMer+/+. n=3 camundongos fêmeas F2 (Mer / MyD88flox+/+).

O processo inflamatório no coração foi estimado, pelo exame direto no microscópio, da intensidade do infiltrado leucocitário no pericárdio, endocárdio e miocárdio, tanto do ventrículo como do átrio, assim como a eventual presença de edema pericárdico. Em cada um dos animais, diferentes lâminas do coração foram avaliadas, atribuindo a cada uma destas, “score” de 0 a 5 nos diferentes quesitos. Os valores finais outorgados para cada quesito em um determinado animal foram calculados pela média dos conceitos atribuídos em cada uma das lâminas (**Fig. 17**).

Patologia Cardíaca de camundongos MerCreMer+/+ vs F2 (Mer / MyD88flo^x/+) (10dpi).

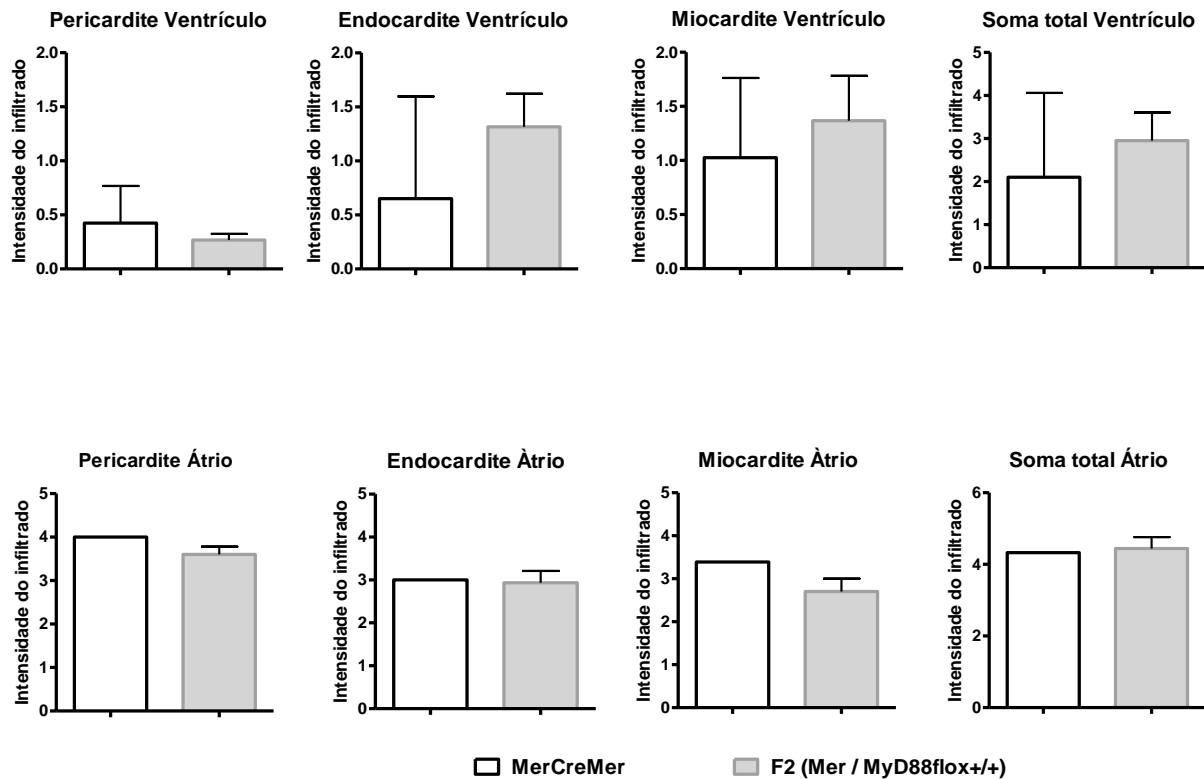


Figura 17- Análise histopatológica no coração. Pericardite, endocardite e miocardite no ventrículo (acima) e no átrio (abaixo) dos camundongos MerCreMer+/+ e F2 (Mer / MyD88flo^x/+) no dia 10 p.i.. Todos os animais foram tratados com tamoxifeno e infectados com 5×10^2 parasitas i.p. e sacrificados no dia 10 após infecção. Para cada um dos órgãos foram realizados 10 cortes com espaços entre corte e corte de 90 μ m. n= 4 camundongos fêmeas para MerCreMer+/+. n=3 camundongos fêmeas F2 (Mer / MyD88flo^x/+).

Os nossos resultados mostram que no dia 10 p.i. não há diferenças significativas na intensidade do infiltrado celular (exibido nas diferentes regiões do ventrículo: pericárdio, endocárdio e miocárdio) entre os animais F2 (Mer / MyD88flo^x/+) e MerCreMer+/+ tratados com tamoxifeno e infectados (**Fig. 17**). Assim, os resultados desta experiência preliminar, não conclusiva, sugere não haver diferenças na patologia cardíaca no dia 10 p.i. entre os animais MerCreMer+/+ e F2 (Mer / MyD88flo^x/+).

4.3.7 Avaliação histopatológica do coração nos camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+) e MerCreMer+/+ tratados com tamoxifeno e infectados com *Trypanosoma cruzi* da cepa Y por 28 dias.

Este segundo experimento avalia o comprometimento cardíaco nos camundongos que apresentam deleção da molécula MyD88 nos cardiomiócitos (F2 (Mer / MyD88flox+/+), comparados com o grupo controle MerCreMer+/+ em uma etapa mais avançada da infecção por *T. cruzi*. Tanto os camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+) como os camundongos do grupo controle MerCreMer+/+ foram tratados com tamoxifeno por 5 dias e, 5 semanas mais tarde, infectados com *T. cruzi*. Após 28 dias de infecção, os animais foram sacrificados e seus corações, perfundidos. Após a perfusão, o coração foi pesado e retirado para emblocamento em parafina, para sua posterior análise histopatológica.

Nesta fase (início da fase crônica), o peso do coração não exibe diferença significativa entre os grupos (**Fig 18**).

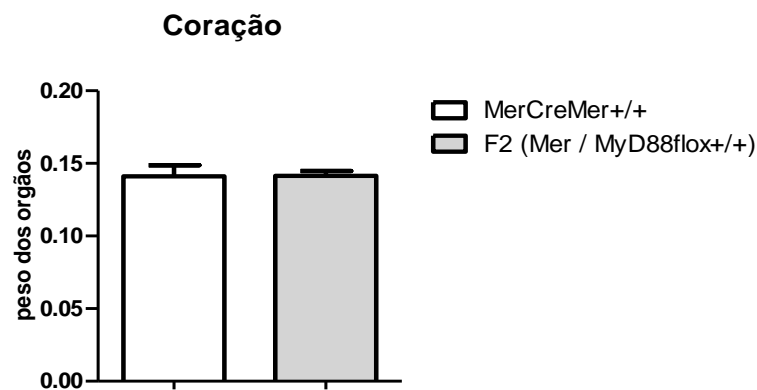


Figura 18- Peso do coração dos animais MerCreMer+/+ e F2 (Mer / MyD88flox+/+). tratados com tamoxifeno e infectados com 5×10^2 parasitas via i.p.. n=10 camundongos machos para cada grupo. O resultado não exibe diferença significativa.

Avaliamos a intensidade de infiltrado celular (miocardite, pericardite e número de ninhos), tanto no ventrículo como no átrio do coração. Cada um dos cortes realizados recebeu um “score” de 0 a 5 de acordo com o nível de infiltrado inflamatório presente no tecido (**Fig 18**).

Patologia Cardíaca de camundongos MerCreMer+/+ vs F2 (Mer / MyD88flox+/+) (28 dpi).

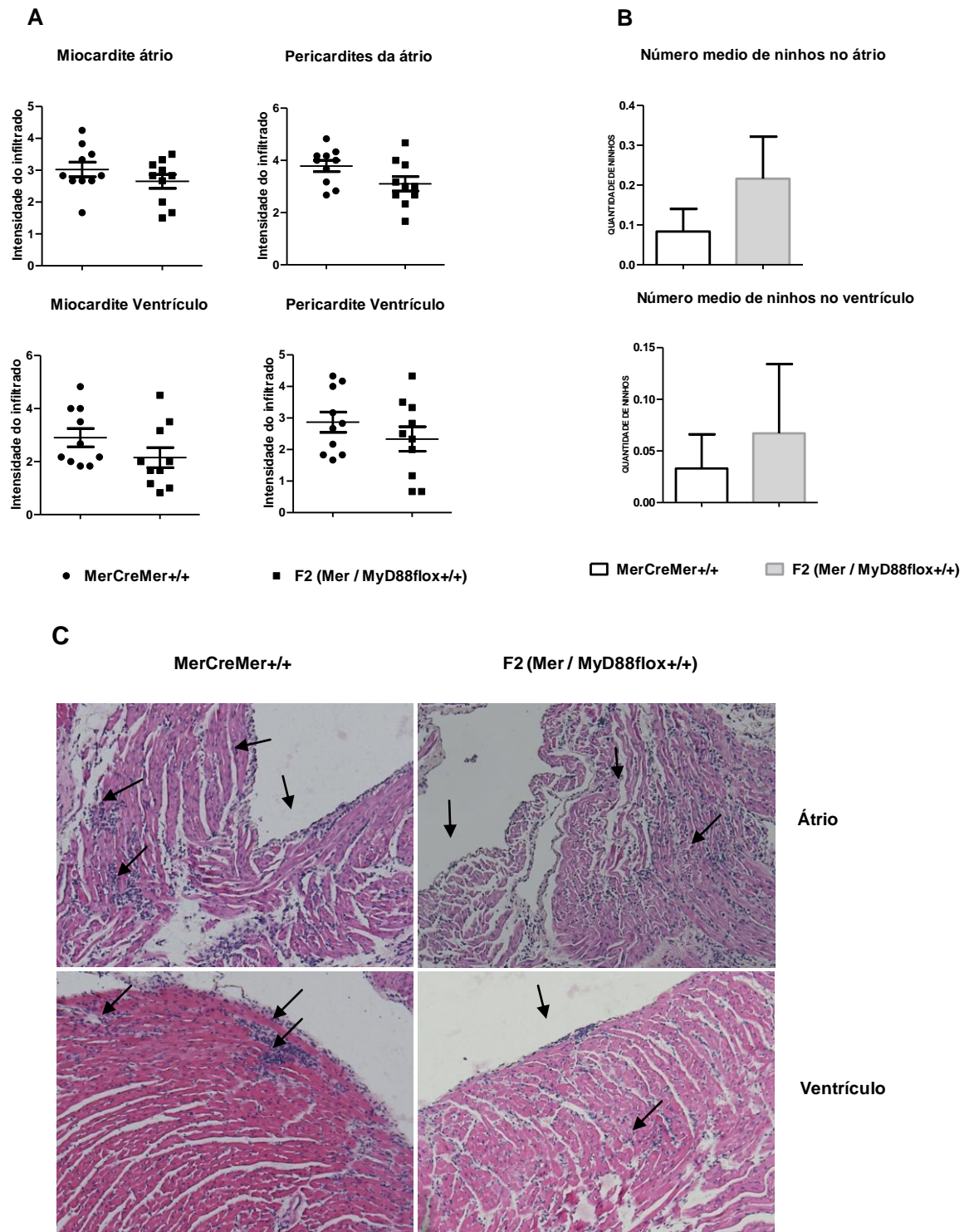


Figura 19- Análise histopatológico no coração. Pericardite, miocardite e número de ninhos no átrio (acima) e no ventrículo (abaixo) (A, B) dos camundongos MerCreMer+/+ e F2 (Mer / MyD88flox+/+) no dia 28 p.i.. Todos os animais foram tratados com tamoxifeno e infectados com 5×10^2 parasitas i.p. e sacrificados no dia 28 após infecção. (C) figura ilustrativa mostrando o infiltrado (as setas indicam o infiltrado celular). Para cada um dos órgãos foram

realizados 3 cortes com espaços entre corte e corte de 90 μ m. Não houve diferenças significativas. n= 10 camundongos machos para cada grupo.

O resultado mostra que no dia 28 após infecção não houve diferenças significativas na intensidade do infiltrado celular no coração entre os animais F2 (Mer / MyD88flox+/+) e os animais MerCreMer+/+ (**Fig 18**), sugerindo assim que até esta etapa da infecção a molécula MyD88 nos cardiomiocitos não é significativamente importante no controle e eliminação do parasita no coração.

5 DISCUSSÃO

Experiências realizadas no nosso laboratório e outros laboratórios mostraram que cardiomiócitos isolados de camundongos recém-nascidos produzem citocinas pró-inflamatórias e expressam receptores TLRs. No entanto, o fato das culturas de cardiomiócitos estarem frequentemente contaminadas com fibroblastos e outras células, não permite sermos 100% conclusivos em relação à presença de MyD88 nas células musculares do coração. Para confirmar que os cardiomiócitos expressam o adaptador MyD88, estudamos a expressão gênica e protéica desta molécula em células HL-1, uma linhagem murina derivada de um tumor de cardiomiócitos. Utilizando estas células verificamos que tanto o número de transcritos como a expressão proteica da molécula MyD88 são maiores quando são comparadas com tecido do coração de animais MyD88KO, resultado que apoia fortemente a presença deste adaptador nas células estruturais do coração.

O próximo passo foi usar um modelo *in-vivo* para eliminarmos a molécula MyD88 exclusivamente nos cardiomiócitos. Para isto obtivemos camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+), resultado dos cruzamentos de camundongos MerCreMer+/+ com camundongos MyD88flox+/+, nos quais o tratamento com tamoxifeno permitiria a eliminação seletiva do gene MyD88 unicamente nos cardiomiócitos. Nestes animais, o efeito do tratamento com tamoxifeno mostrou-se altamente eficiente, uma vez que o número de transcritos de MyD88 no coração, estimado por RT-PCR, mostrou-se equivalente ao observado no coração de camundongo MyD88KO. Ainda, o efeito do tamoxifeno mostrou-se altamente seletivo para o tecido cardíaco, uma vez que nos animais F2 (Mer / MyD88flox+/+) tratados a transcrição de MyD88 pelo baço se mostrou inalterada.

Por outro lado, os nossos estudos da transcrição de MyD88 no coração revelaram que, tanto em camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+) como em camundongos MerCreMer+/+, o átrio apresenta maior quantidade de transcritos do que o ventrículo. De qualquer forma, nos camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+) o tratamento com tamoxifeno reduziu a expressão de MyD88 em ambos compartimentos cardíacos. A maior expressão de MyD88 no átrio poderia estar relacionado à uma maior

vulnerabilidade à infecção neste compartimento. Entretanto, não podemos descartar no momento outras explicações tais como: maior presença relativa de RNAs de MyD88 oriundos de outras células (não cardiomiócitos) no átrio do que no ventrículo, o que poderia ser devido a uma maior quantidade de células endoteliais e fibroblastos no átrio.

Em relação aos camundongos controle, os camundongos tratados com tamoxifeno e infectados pelo *T. cruzi* não apresentaram alterações na curva de parasitemia e no peso do coração. Além disso, alguns destes camundongos (grupo controle MerCreMer+/+ e grupo experimental F2 Mer / MyD88flox+/+) morreram durante a fase aguda e, mais especificamente, no final desta (17-22 dias após infecção do *T. cruzi*) sem apresentar diferença significativa na curva de mortalidade. Acreditamos que estes efeitos decorram da interferência do tamoxifeno na sinalização por estrógenos endógenos, que sabidamente influenciam a ativação da resposta imune. Além disso, trabalhos anteriores demonstraram que, após tratamento com tamoxifeno, os camundongos podem desenvolver alterações funcionais cardíacas que revertem após 9 dias (Hall et al., 2011 e Koitabashi et al., 2009). Assim, nos animais tratados e seguidamente infectados pelo *T. cruzi* é possível que o conjunto destes fatores determine uma maior susceptibilidade ao parasita resultando em mudanças na parasitemia e mortalidade. Nesta etapa também examinamos se, além do tamoxifeno, poderia haver alguma outra substância que afetasse a curva de parasitemia. Com este objetivo avaliamos o efeito tóxico do óleo de girassol, no qual é dissolvido o tamoxifeno, mas não encontramos nenhum efeito sobre a parasitemia, indicando que o tamoxifeno deve ser o único responsável pelos câmbios apresentados nas experiências preliminares. Para contornar estes problemas passamos a realizar a infecção às quatro semanas como mínimo depois de finalizado o tratamento com tamoxifeno, protocolo com o qual os camundongos passaram a mostrar uma mortalidade não muito diferente à do grupo controle não tratado. Desta forma, para os experimentos seguintes, adotamos o esquema de infectar com o *T. cruzi* quatro ou mais semanas depois do tratamento com tamoxifeno, e passamos a incluir, como grupo controle, os camundongos MerCreMer+/+ igualmente manipulados. Utilizando este novo protocolo, observamos não haver diferença na parasitemia dos dois grupos.

O nosso próximo passo nesta etapa foi realizar a análise histopatológica comparativa do coração dos animais F2 (Mer / MyD88flox+/+) e MerCreMer+/, que foram tratados com tamoxifeno e infectados por 10 dias. As variáveis avaliadas foram o número de ninhos e intensidade dos infiltrados inflamatórios presentes no átrio e ventrículo. Contudo, a nossa análise comparativa teve que se limitar ao ventrículo, uma vez que em três dos quatro animais MerCreMer+/+ perdemos os átrios no processamento do coração. De qualquer forma, a análise comparativa dos ventrículos não mostrou diferença significativa entre os grupos F2 (Mer / MyD88flox+/+) e MerCreMer+/, tanto no que se refere ao número de ninhos, como à intensidade dos infiltrados. Interessantemente, nos animais em que conseguimos estudar o átrio, a avaliação comparativa entre átrio e ventrículo mostrou que tanto o número de ninhos como o infiltrado inflamatório foram mais elevados nas aurículas. Desconhecemos se isto pode estar de alguma forma relacionado com a maior expressão da molécula MyD88 nesta região. No início da infecção da fase aguda (dia 13) analisamos o nível de *T. cruzi* vivo no coração através da cultura de alíquotas de tecido cardíaco em meio LIT, sem achar diferenças significativas entre os grupos estudados.

Finalmente o nosso seguinte passo foi comparar o grupo controle MerCreMer+ com o grupo experimental F2 (Mer / MyD88flox+/+), ambos tratados com tamoxifeno, no dia 28 após infecção. Através da análise histopatológica do coração nos animais destes dois grupos, estimamos a intensidade da miocardite e pericardite, assim como o número de ninhos, no átrio e ventrículo. Os resultados obtidos não mostraram diferenças significativas nesta etapa (dia 28) da infecção. Contudo, pode se notar que o infiltrado celular tende a ser maior no grupo controle comparado com o grupo experimental, enquanto se observa o contrário em relação à carga parasitária. Uma vez que estas tendências poderiam estar relacionadas à deleção de MyD88 nos cardiomiócitos do grupo F2 (Mer / MyD88flox+/+) tratado com tamoxifeno, acreditamos que o papel desta molécula adaptadora nos cardiomiócitos deve ser estudado em etapas mais avançadas da infecção.

6 CONCLUSÕES

- Cardiomiócitos HL-1 não infectados, ou infectados com tripomastigotas de cultura das cepas Y ou Sylvio X10/4 do *Trypanosoma cruzi*, expressam a molécula MyD88, o que foi concluído comparando a sua expressão nestas células com aquela no coração de animais MyD88KO.

- O tratamento com tamoxifeno de camundongos F2 (Mer / MyD88flox+/+) resulta em redução significativa da expressão de MyD88 no coração, mas não no baço. Este resultado valida o modelo experimental F2 (Mer / MyD88flox+/+) / tamoxifeno como apropriado para avaliar o eventual papel de MyD88 (expresso nos cardiomiócitos) na infecção murina pelo *T. cruzi*.

- A redução da expressão de MyD88 no coração F2 (Mer / MyD88flox+/+) persiste por no mínimo até 5 semanas após o tratamento com tamoxifeno.

- A expressão gênica da molécula MyD88 no coração mostra diferença significativa entre a aurícula e o ventrículo do mesmo animal.

- A avaliação histopatológica dos ventrículos dos animais infectados pelo *T. cruzi* por 10 e 28 dias não mostraram diferenças significativas quando comparados o grupo experimental F2 (Mer / MyD88flox+/+) com o grupo controle MerCreMer+/+.

- A avaliação histopatológica dos átrios nos animais infectados pelo *T. cruzi* por 28 dias não mostrou diferenças significativas entre o grupo experimental F2 (Mer / MyD88flox+/+) e o grupo controle MerCreMer+/+.

REFERÊNCIAS*

Aliberti JC, Cardoso, MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira Silva JS. Interleukin-12 Mediates Resistance to *Trypanosoma cruzi* in Mice and Is Produced by Murine Macrophages in Response to Live Trypomastigotes. *infection and immunity*. 1996;1961–1967.

Antonson P, Nalvarte I, Varshney M, Xu L, Windahl HS, Humire P, Ohlsson C, Gustafsson J, Dahlman-Wright K. Identification of proteins highly expressed in uterine fluid from mice with hydrometra. *Biochemical and Biophysical research communications*. 2015;Vol.466:650-655.

Arthur JC, Lich JD, Wilson JE, Ye Z, Allen IC, Gris D, Schneider M, Roney KE, O'Connor BP, Moore CB, Morrison A, Sutterwala FS, Bertin J, Koller BH, Liu Z, Ting JP. NLRP12 controls dendritic and myeloid cell migration to affect contact hypersensitivity. *J Immunol*. 2010;Vol.15:4515–4519.

Bartholo RM, Bartholo TP, Imunidade inata e a importância dos receptores Toll-similar. *Pulmão RJ*. 2009;Vol.2:52-58.

Biolo, A.; Ribeiro, A. L.; Clausell, N. Chagas cardiomyopathy – where do we stand after a hundred years? *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2010;Vol.52:300-316.

Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O. “Activation of toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite,” *J Immunol*, 2001;Vol. 167: 416–423.

Campos MA, Valente EP, Cardoso JE, Akira S, Alvarez-Leite JI, Ropert C, Gazzinelli RT. Impaired Production of Proinflammatory Cytokines and Host Resistance to Acute Infection with *Trypanosoma cruzi* in Mice Lacking Functional Myeloid Differentiation Factor 88. *J Immunol*. 2004;Vol.172:1711-1718.

Castoldi A, Braga TT, Correa-Costa M, Aguiar CF, Bassi EJ. Et al 2012. TLR2, TLR4 and the MYD88 Signaling Pathway Are Crucial for Neutrophil Migration in Acute Kidney Injury Induced by Sepsis. *PLoS ONE*. 2012;Vol.7(5): e37584. doi:10.1371/journal.pone.0037584.

Chen H, Jiang Z. The essential adaptors of innate immune signaling. *Protein e cell*. 2012;Vol.4:27-39.

Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ. HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;Vol.95(6):2979–2984.

Coelho PS, Klein A, Talvani A, Coutinho SF, Takeuchi O. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. *J Leukoc Biol*. 2002;Vol.71:837–844.

Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995;Vol.92:3541-3545.

De Souza MM, Andrade SG, Barbosa AA, Macedo Jr, Santos RT, Alves VA, Andrade ZA. *Trypanosoma cruzi* Strains and Autonomic Nervous System Pathology in Experimental Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996.Vol.91 (2):217-24.

Gonçalves VM, Matteucci KC, Buzzo CL, Miollo BH, Ferrante D, Torrecilhas AC, Rodrigues MM, Alvarez JM, Bortoluci KR. NLRP3 controls *Trypanosoma cruzi* infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2013;Vol.7(10):e2469. doi:10.1371/journal.pntd.0002469.

Gravina HD, Antonelli L, Gazzinelli RT, Ropert C. Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with *Trypanosoma cruzi*. *Plos One*. 2013;Vol.8: e63100.doi:10.1371/journal.pone.0063100.

Hall. Systolic dysfunction in cardiac-specific ligand-inducible MerCre Mertransgenic mice. *Physiol Heart Circ Physiol*. 2011.Vol.301: 253–260.

Henao-Martínez AF, Schwartz DA, Yang IV. Chagasic cardiomyopathy, from acute to chronic: is this mediated by host susceptibility factors?. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;Vol.106:521–527.

Hoshi N, Schenten D, Nish SA, Walther Z, Gagliani N, Flavell RA, Reizis B, Shen Z, Fox JG, Iwasaki A, Medzhitov R. MyD88 signalling in colonic mononuclear phagocytes drives colitis in IL-10-deficient mice. *Nat Commun*. 2012;Vol.3:1-10.

Jones EM, Colley DG, Tostes S. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1993;Vol.48:348-357.

Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert. Rev. Mol. Med*. 2010;Vol.12:29.

Kagan JC, Magupalli VG, Wu H. SMOCs: supramolecular organizing centres that control innate immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2014;Vol.14:821-826.

Kim YK, Shin JS, Nahm MH. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med.* 2016;Vol.57(1):5-14.

Koitabashi N, Bedja D, Zaiman AL, Pinto YM, Zhang M, Gabrielson KL, Takimoto E, Kass DA. Avoidance of Transient Cardiomyopathy in Cardiomyocyte-Targeted Tamoxifen-Induced MerCreMer Gene Deletion Models. *Circulation Research* is published by the American Heart Association. 2009;Vol.105:12-15.

Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Teixeira SM, Factor LM, Weiss, Fnu N, Herbert B, Tanowitz GJ. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin. Immunopathol.*, 2012;Vol.34:753-770.

Machado FS, Martins GA, Aliberti CS, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva J S. *Trypanosoma cruzi*-Infected Cardiomyocytes Produce Chemokines and Cytokines That Trigger Potent Nitric Oxide-dependent Trypanocidal Activity. *Circulation.* 2000.Vol.102:3003-3008.

Maggi A, Villa A. In vivo dynamics of estrogen receptor activity: The ERE-Luc model. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 2012;Vol.139:262– 269.

Manzanilla-lopez RH, Clark IM, Atkins SD, Hirsch PR, Kerry BR. Rapid and reliable DNA extraction and PCR fingerprinting methods to discriminate multiple biotype s of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* isolated from plant rhizospheres. *Letters in Applied Microbiology.* 2009.Vol.48:71–76.

Marinho CR, Bucci DZ, Dagli ML Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a *Trypanosoma cruzi* clone: a model for genetic studies of Chagas' disease, *Infection and Immunity*, 2004;Vol.72: 2350-2357.

Marinho CR, Nuñez-Apaza LN, Bortoluci KR, Bombeiro AL, Bucci DZ, Grisotto MG, Sardinha LR, Jorquera CE, Lira S, D'Império-Lima MG, Álvarez JM. Infection by the SylvioX10/4 clone of *Trypanosoma cruzi* :relevance of a low-virulence model of Chagas disease. *Microbes and Infection.* 2009;Vol.11:1037-1045.

Marinho CR, Nuñez-Apaza LN, Martins-Santos R, Bastos KRB, Bombeiro AL, Bucci DZ, Sardinha LR, D'Império-Lima MG, Álvarez JM. IFN- γ , But not nitric oxide or specific IgG, is essential for the in vivo control of low-virulence Sylvio X10/4 *Trypanosoma cruzi* parasites. *Scandinavian Journal of Immunology.* 2007;Vol.66:297-308.

Marin-Neto JA. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, 2007;Vol.115:1109-23.

Martins-Melo FR, Alencar CH, Ramos AN Jr, Heukelbach J. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;Vol.6(2):e1508.

Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD. Measuring the Burden of Neglected Tropical Diseases: The Global Burden of Disease Framework. *PLoS Negl Trop Dis.*, 2007;Vol.1 (2):1-15 e114.doi:10.1371/journal.pntd.0000114.

Metzger, D.; Chambon, P. Site- and Time-Specific Gene Targeting in the Mouse. *Methods.* 2001;Vol.24:71–80.

Ouaisi A, Guilvard E, Delneste Y, Caron G, Magistrelli G, Herbault N, Thieblemont N, Jeannin P. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J Immunol.* 2002.Vol.168:6366-6374.

Rassi JA, Rassi A, Marcondes RJ. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin N Am.* 2012;Vol.26:275–291.

Rassi JA, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas Disease. *Lancet.* 2010;Vol.375:1388–402.

Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Report of the TDR Disease Reference Group, 2012;No. 975:11-64.

Rodrigues MM, Oliveira AC, Bellio M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. *Journal of Parasitology Research.* 2011;Vol.2012:12.

Rosas QR, Gaillardin C. The system Cre/loxP as a tool in the molecular study of *Yarrowia lipolytica*. *REVISTA MEXICANA DE MICOLOGÍA.* 2011;Vol.33:17-27.

Santos A, Letro RB, Bem VAL, Azeredo BVM, Coelho GLLM, Diotaiuti L, Assis GFM, Lana M. Avaliação do Programa de Controle da Doença de Chagas em Açucena Município, Vale do Rio Doce, Estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev. Soc.Bras.Med.Trop.* 2014.Vol.47: no. 2.

Saxena M, Yeretssian G. NOD-like receptors: master regulators of inflammation and cancer. *Immunol.* 2014;Vol. 5: 25. | <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00327>

Silva GK, Costa RS, Silveira TN, Caetano BC, Horta CV, Gutierrez FR, Matta-Guedes PM, Andrade WA, Niz M, Gazzinelli RT, Zamboni DS, silva JS. Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain Inflammasomes Mediate IL-1b Response and Host Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Immunol.* 2013;Vol.191:3373–3383.

Silva GK, Gutierrez FR, Guedes PM, Horta CV, Cunha LD, Mineo TW, Silva JS, Kobayashi KS, Flavell RA, Silva JS, Zamboni DS. Cutting Edge: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1-Dependent Responses Account for Murine Resistance against *Trypanosomacruzi* Infection. *J Immunol.* 2010;Vol.184:1148-1152.

Sohal DS, Nghiem M, Crackower MA, Witt SA, Kimball TR, Tymitz KM, Penninger JM, Molkentin JD. Temporally Regulated and Tissue-Specific Gene Manipulations in the Adult and Embryonic Heart Using a Tamoxifen-Inducible Cre Protein. *Circulation Research*. 2001;Vol.89:1524-4571.

Souza W, Carvalho T, Barrias E. Review on *Trypanosoma cruzi* : Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology*. 2010.Vol.2010:18.Article ID 295394.

Suematsu N, Isohashi F. Rapid and simple screening of transgenic mice: novel extraction-free, filter-based PCR genotyping from blood samples. *Acta biochimica Polonica*. 2006;Vol.53:613–616.

Tanowitz HB, Huang H, Jelicks LA, Chandra M, Loredó ML, Weiss LM, Factor SM, Shtutin V, Mukherjee S, Kitsis RN, Christ GJ, Wittner M, Shirani J, Kisanuki YY, Yanagisawa M. Role of Endothelin 1 in the Pathogenesis of Chronic Chagasic Heart Disease. *Infection and Immunity*. 2004;Vol.73:2496-2503.

Tarleton RL. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol*. 2007;Vol.19(4):430-4.

Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease, *International Journal of Parasitology*, 2001;Vol.31:550-554.

Wang C, Deng L, Hong H, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*.2001;Vol.412 (6844): 346-51.

Warner N, Núñez G. MyD88: A Critical Adaptor Protein in Innate Immunity Signal Transduction. *J. Immunol*. 2013;Vol.190:3–4.

Watters TM, Kenny EF, O'Neill L.A. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunology and Cell Biology*. 2007;Vol.85: 411–419.

Westphalen EVN, Bisugo MC, Araújo MFL. Aspectos epidemiológicos e históricos do controle da doença de Chagas no Continente Americano. *BEPA*, 2012.Vol.9:105.

World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). [cited 2015 Mar 15]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en>.