

PAULO CÉSAR FERREIRA DOS SANTOS

**Modulação da sinalização imune de células cardíacas frente ao *priming* por
IFN- γ**

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

PAULO CÉSAR FERREIRA DOS SANTOS

**Modulação da sinalização imune de células cardíacas frente ao *priming* por
IFN- γ**

Dissertação apresentada ao Departamento de 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)

Ferreira dos Santos, Paulo César
Modulação da sinalização imune de células cardíacas
frente ao priming por IFN-g / Paulo César Ferreira
dos Santos; orientador José Maria Álvarez Mosig. --
São Paulo, 2016.
73 p.

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

1. Doença de Chagas. 2. Cardiomiócitos. 3.
Priming. 4. IFN-g. 5. LPS. I. Álvarez Mosig, José
Maria, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Paulo César Ferreira dos Santos

Titulo da Dissertação/Tese: Modulação da sinalização imune de células cardíacas frente ao *priming* por IFN- γ

Orientador: Prof. Dr. José Maria Álvarez Mosig

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica 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 **82** nas fls. **21** 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 "*Pesquisa - Mestrado*" do qual participam o(s) aluno(s) **Paulo César Ferreira dos Santos** 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 **23.09.2014**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 26 de setembro de 2014.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice- Coordenador- CEUA- ICB/USP

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

Dedico esta dissertação aos meus pais e a meu irmão,
por quem tenho amor eterno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus sobre todas as coisas, por ter possibilitado todos os desafios e bençãos que me trouxeram até a conclusão deste trabalho. Sem a certeza Dele em minha vida, nada faria sentido.

Meu agradecimento ao Prof. Claudio Vieira da Silva, que desde minha tenra idade no mundo acadêmico, acreditou no potencial transformador da Ciência na vida de um jovem universitário. Por ele, comecei a construir núcleos familiares longe dos laços genéticos. Com certeza, o LATRI será sempre um dos meus recantos mais amados.

Ao Prof. José Maria Álvarez Mosig por ter aceito o desconhecido mineiro que vinha com ambições e interesses, sem mesmo conhece-lo. Este trabalho é fruto de um sentimento de interesse e paixão, compartilhado, por brasileiros e, agora sei, por espanhóis.

A Iara, Ianna, Manoela, Cíntia, Alessandra, Ana Luiza, Douglas e Igor, por acompanharam essa jornada de longe, mas sempre no coração.

Aos amigos do time de vôlei da A.A.A. XII de Fevereiro, por serem a melhor válvula de escape e terapia semanal que poderia encontrar.

Agradeço a todos os amigos feitos no Laboratório de Doenças Infecciosas, Rogério, Aurea, Silvana, Danny, Raíssa, Maria, Érika, Alexandra, Eduardo, Caio, Renan, Rafael T., Isabela e Flávia. De alguma forma, vocês também participaram da construção desse trabalho.

Em especial, agradeço a família que se formou e me acolheu também, apoiando nos momentos de dificuldade e passando por todos os desafios que a vida nos oferece em período de tamanha importância. Rafael Moyses e Beatriz, vocês são os irmãos que encontrei nessa curva da vida e que eu agradeço enormemente por esse carinho. Essa família não estaria completa sem Rosana, Felipe e Teresa. Hoje se encontram longe do nosso abraço, mas sempre perto do coração. Nossos risos e lágrimas me fazem ser uma pessoa melhor a cada dia. Sinto muito a falta de todos vocês juntos.

Por fim, agradeço pelo amor traduzido em abdicção. Aos meus pais, Eliane e Marco Paulo, e ao meu irmão, Marco Túlio, não há um dia que eu não pense em vocês. Abrir mão do convívio diário em prol dos nossos sonhos é algo que afeta não só ao desbravador, mas também aqueles que ficam. Ama-los é natural, incondicional

e vital. Visitar Uberlândia para fugir da loucura do dia-a-dia é uma desculpa esfarrapada que eu uso para poder ver vocês e sentir o calor do abraço que só os Ferreira dos Santos tem.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Doenças Infecciosas do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. José Maria Álvarez Mosig. O presente projeto recebeu auxílio financeiro e bolsa da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo) – processo número 2014/17586-0.

“Temos todo o tempo do mundo

(...)

Nosso suor sagrado é bem mais belo que esse sangue amargo”

Renato Russo

RESUMO

Santos PCF. Modulação da sinalização imune de células cardíacas frente ao *priming* por IFN- γ . [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

A Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC) é o elemento mórbido mais importante da Doença de Chagas e sua elucidação se tornou fundamental. Estudos da imunologia da CCC demonstram que o sistema imune desempenha um papel duplo no curso da doença, agindo de forma a controlar as formas parasitárias e ainda promovendo lesão tissular. Porém, pouco se sabe do papel das células estruturais, tais como os cardiomiócitos, no curso da doença. Sabe-se que, em outras patologias cardíacas, o IFN- γ , citocina produzida em abundância no coração dos pacientes com CCC, determina o “*priming*” de diversas populações celulares, modulando positivamente a sua resposta. Cardiomiócitos HL-1 e animais C3H/HePas foram primados com IFN- γ e desafiados com LPS para a dosagem de citocinas, simulando quadro agudo e crônico de infecção. Neste trabalho, determinamos que o IFN- γ modula positivamente a produção de diversas citocinas *in vitro* por células HL-1 (IP-10, MCP-1, G-CSF, RANTES, MIG, IL-6, MIF) e também *in vivo* no coração (IP-10, KC, G-CSF, LIF e IL-6). Além disso, *in vitro*, o IFN- γ foi capaz de diminuir a produção de VEGF e GM-CSF em relação aos grupos tratados apenas com LPS. Os dados corroboram a literatura e permitem concluir que os cardiomiócitos são capazes de participar ativamente da resposta inflamatória no coração e que são sensíveis aos produtos da mesma. O trabalho serve ainda de base para novos estudos sobre o perfil de citocinas expressas no coração no curso da infecção por *T. cruzi* e como os cardiomiócitos participam da resposta inflamatória em questão.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Cardiomiócitos. *Priming*. IFN- γ . LPS.

ABSTRACT

Santos PCF. Modulation of the immune signaling of cardiac cells by IFN- γ priming. [dissertation (Masters thesis in Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Chronic Chagasic Cardiomyopathy (CCC) is the most morbid element of Chagas' Disease, the elucidation of its physiopathology being fundamental. Researchers working with CCC have demonstrated that the immune system plays a dual role in the disease, being crucial for the local control the parasite, but also promoting tissue damage. However, little is known about the role of structural cells, such as cardiomyocytes, in the course of the disease. In other cardiac pathologies, it has been shown that IFN- γ , a cytokine abundant at the heart of patients with CCC, determines the priming of several resident populations, positively modulating their response. In this work, HL-1 cardiomyocytes and C3H/HePas mice were primed with IFN- γ (in brief or extended protocols) and challenged with LPS, the cytokines produced being measured in the supernatants. We observed that IFN- γ positively modulates the *in vitro* production of many cytokines by HL-1 cells (IP-10, MCP-1, G-CSF, RANTES, MIG, IL-6, MIF) and also their *in vivo* production at the heart (IP-10, KC, G-CSF, LIF and IL-6). Besides, IFN- γ was able to decrease the LPS-induced production of VEGF and GM-CSF by HL-1 cells. Our data allow us to conclude that cardiomyocytes actively participate in the inflammatory response of the heart, being sensitive to products released by professional immune cells. This work may serve as a basis for further studies on the profile of the cytokines secreted in the heart tissue along the course of *T. cruzi* infection, and about the participation of cardiomyocytes in this process.

Keywords: Chagas Disease. Cardiomyocytes. Priming. IFN- γ . LPS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção de IL-6 e IL-10 por células HL-1 quando passam por desafio de LPS.....	30
Figura 2 - Produção de IL-6 por células HL-1 primadas com IFN- γ quando passam por desafio de LPS.....	31
Figura 3 - Produção de IL-6 e IL-10 por células HL-1 primadas com IFN- γ quando passam por desafio de LPS.....	32
Figura 4 - Produção de IL-6 e IL-10 por células HL-1 primadas com IFN- γ 24 h após passarem por desafio de LPS.....	33
Figura 5 - Produção de TNF- α e M-CSF por células HL-1 primadas com IFN- γ 24 h após passarem por desafio de LPS.....	34
Figura 6 - Produção de IL-1 α , KC, MIP-2, LIF e LIX por células HL-1 primadas com IFN- γ 24 h após passarem por desafio de LPS.....	35
Figura 7 - Produção de IL-6, IP-10, MCP-1, G-CSF, RANTES, MIG, VEGF e GM-CSF por células HL-1 primadas com IFN- γ 24h após passarem por desafio de LPS.....	36
Figura 8 - Produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 por células HL-1 primadas com IFN- γ quando passam por desafio de LPS.....	37
Figura 9 - Produção de IL-6 após dose alta de IFN- γ e desafio de LPS.	39
Figura 10 - Produção de TNF- α após dose alta de IFN- γ e desafio de LPS.....	40
Figura 11 - Dosagem de TNF- α do soro de animais C3H/HePas tratados com dose alta de IFN- γ e desafiados com LPS.....	41
Figura 12 - Produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 pelo coração após dose alta de IFN- γ e desafio de LPS.....	42
Figura 13 - Produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 pelo fígado após dose alta de IFN- γ e desafio de LPS.....	43
Figura 14 - Produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 pelo baço após dose alta de IFN- γ e desafio de LPS.....	44
Figura 15 - Dosagem de TNF- α , IL-6 e IL-10 do sangue ne animais C3H/HePas tratados com dose alta de IFN- γ e desafiados com LPS.....	44
Figura 16 - Produção de citocinas pelo coração após <i>priming</i> sistêmico continuado por IFN- γ e desafio de LPS.....	46
Figura 17 - Produção de citocinas pelo fígado após <i>priming</i> sistêmico continuado por IFN- γ e desafio com LPS.....	47
Figura 18 - Produção de citocinas pelo coração após <i>priming</i> sistêmico continuado por IFN- γ e desafio com LPS.....	48
Figura 19 - Produção de citocinas pelo fígado após <i>priming</i> sistêmico continuado por IFN- γ e desafio com LPS.....	49
Figura 20 - Produção de citocinas pelo baço após <i>priming</i> sistêmico continuado por IFN- γ e desafio com LPS.....	50
Figura 21 - Concentração de citocinas encontradas no soro após <i>priming</i> sistêmico continuado por IFN- γ e desafio com LPS.....	50
Figura 22 - Curva de dosagem de IL-6 do coração, fígado e soro de animais C3H/HePas desafiados com LPS.....	51

Figura 23 - Curva de dosagem de IL-10 do coração, fígado e soro de animais C3H/HePas desafiados com LPS.....	52
Figura 24 - Produção de citocinas pelo coração após <i>priming</i> sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.....	53
Figura 25 - Produção de citocinas pelo fígado após <i>priming</i> sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.....	54
Figura 26 - Produção de citocinas pelo baço após <i>priming</i> sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.....	54
Figura 27 - Dosagem de citocinas presentes no soro após <i>priming</i> sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.....	55
Figura 28 - Produção de TNF- α , IL-6, Eotaxina, GM-CSF, LIX e MIP-1 α no fígado após <i>priming</i> sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.....	56
Figura 29 - Produção de IL-1 α , IL-1 β , MCP-1, MIG e MIP1- β no fígado após <i>priming</i> sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.....	58
Figura 30 - Produção de RANTES, IP-10, KC, MIP-2, LIF, M-CSF, G-CSF e VEGF no fígado após <i>priming</i> sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.....	59
Figura 31 - Produção de TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , M-CSF, MIP-1 α , MIP-2 e VEGF no coração após <i>priming</i> sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.....	60
Figura 32 - Produção de MCP-1, MIG, RANTES e eotaxina no coração após <i>priming</i> sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.....	61
Figura 33 - Produção de IP-10, KC, G-CSF, LIF e IL-6 no coração após <i>priming</i> sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- “CCC” – Cardiomiopatia Chagásica Crônica
- “cDNA” – DNA complementar
- “CEUA” – Comissão de Ética de Uso de Animais
- CXC – do inglês, *C-X-C motif chemokine*
- “DAMP” – do inglês, *Damage-associated Molecular Pattern*
- “DNA” – ácido desoxirribonucléico
- “G-CSF” – do inglês, *Granulocyte Colony Stimulating Factor*
- “GIPL” - fosfolípídeos-glicoinositol
- “GM-CSF” – do inglês, *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*
- “GPI” - Glicosilfosfatidil-inositol
- “i.p.” – intra peritonial
- “i.v.” – intra venoso
- “IFN- γ ” – interferon γ
- “IL” – interleucina
- “IP-10” – do inglês, *IFN- γ inducible protein 10*
- “KC” – do inglês, *keratinocyte chemottractant*
- “KO” – do inglês, *knock-out*
- “LIF” – do inglês, *Leukemia Inhibitor Factor*
- “LIX” – do inglês, *Lipopolissacaride-inducible CXC chemokine*
- “LPS” – lipopolissacarídeo
- “MCP-1” – do inglês, *Monocyte Chemotactic Protein 1*
- “M-CSF” – do inglês, *Monocyte-cell Stimulating Factor*
- “MIF” – do inglês, *Macrophage Migration Inhibitor Factor*
- “MIG” – do inglês, *Monokine Induced by IFN- γ*
- “MIP-1 α ” - do inglês, *Macrophage Inflammatory Protein α*
- “MIP-1 β ” - do inglês, *Macrophage Inflammatory Protein 1 β*
- “MIP-2” – do inglês, *Macrophage Inflammatory Protein 2*
- “Myd88” – do inglês, *Myeloid differentiation factor 88*
- “NLPR3” – do inglês, *NOD-like receptor Family, pyrin domain containing 3*
- “NOD” – do inglês, *Nucleotide-binding oligomerization domain*
- “PAMP” – do inglês, *Pathogens-Associated Molecular Patterns*

“PRR” – do inglês, *Pattern-Recognition Receptors*

“RANTES” – do inglês, *Regulated upon Activation of Normal T cell Expressed and Secreted*

“IFN- γ RKO” – do inglês, *interferon- γ receptor KO*

“TLR” – do inglês, *Toll-like Receptor*

“TNF- α ” - fator de necrose tumoral α

“TRIF” – do inglês, *Toll-like-receptor-associated activator of interferon*

“VEGF” – do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*

“WHO” – do inglês, *World Health Organization*

α – alfa

β – beta

γ – gama

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Justificativa.....	20
2 OBJETIVO	19
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Aspectos éticos	24
3.2 Animais	24
3.3 Células.....	24
3.4 Ensaios <i>in vitro</i>	24
3.4.1 Curva de produção de citocinas frente ao desafio de LPS.....	24
3.4.2 Efeito do priming com IFN- γ em condição similar a um quadro agudo de infecção cardíaca pelo <i>T. cruzi</i>	24
3.4.3 Efeito do priming com IFN- γ em condição similar a um quadro de C.C.C.	25
3.5 Ensaios <i>in vivo</i>	25
3.5.1 Ensaio com priming com IFN- γ simulando um quadro agudo de infecção cardíaca pelo <i>T. cruzi</i>	25
3.5.2 Ensaio de priming com IFN- γ simulando um quadro crônico de Cardiomiopatia Chagásica Crônica (C.C.C.)	25
3.5.3 Curva de produção de citocinas frente ao desafio de LPS.....	26
3.6 Dosagem de citocinas.....	26
3.6.1 Sangue	26
3.6.2 Órgãos.....	26
3.6.3 Kits de ELISA para dosagem de citocinas.....	26
3.6.4 Quantificação de mRNA de citocinas	26
3.6.5 Quantificação de citocinas/quimiocinas via Multiplex	27
3.7 Análises Estatísticas.....	27
4 RESULTADOS	31
4.1 Experimentos <i>in vitro</i>	29
4.2 Experimentos <i>in vivo</i>	38
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	69

A Doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, representa um problema de saúde mundial, uma vez que não possui vacina preventiva e afeta em torno de 7 a 8 milhões de indivíduos, principalmente na América Latina. Dos pacientes na fase crônica da doença, 30% desenvolvem alterações cardíacas e 5% alterações digestivas, sendo a Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC) a mais caracterizada. O tratamento envolve a eliminação das formas do parasita do hospedeiro e de suas complicações patológicas. Entretanto, não há cura efetiva para as formas crônicas da doença (World Health Organization, 2015).

Uma vez que a cardiomiopatia chagásica crônica é o elemento mórbido principal da Doença de Chagas, seu estudo torna-se fundamental. Atualmente, admite-se que o infiltrado inflamatório no tecido cardíaco infectado pelo *T. cruzi* tenha um papel duplo (Alvarez et al., 2014). Assim, apesar das células linfo-monocitárias infiltrantes serem fundamentais no controle local do parasita, as proteases, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas por estas mesmas células determinam níveis importantes de lesão tissular, que se somam à destruição/desorganização induzida pelo próprio parasita. O papel duplo da resposta imune acontece como consequência do caráter crônico da cardiomiopatia chagásica que, por sua vez, é o resultado da persistência do parasita no local. Assim, no contexto da persistência do parasita no coração do indivíduo infectado, o infiltrado inflamatório cardíaco torna-se crônico, e, em consequência, perpetua-se a liberação local de mediadores indutores de dano tecidual (Alvarez et al., 2014; Raberg et al., 2007).

A presença de um número pequeno de ninhos de *T. cruzi* no coração de animais infectados (Marinho et al., 2009) é considerada hoje o resultado de uma deficiência na resposta imune parasita-específica que não consegue promover a destruição total dos parasitas no tecido cardíaco. Neste contexto, diferentes trabalhos têm identificado falhas ou limitações em diferentes setores da resposta efetora do sistema imune como elementos responsáveis pela incapacidade para promover a remoção estéril do *T. cruzi*.

Na procura das causas subjacentes à eliminação incompleta do *T. cruzi* no coração do indivíduo infectado, tem se ignorado, entretanto, que as células estruturais deste órgão (cardiomiócitos, fibroblastos e células endoteliais dos vasos) talvez desempenhem um papel importante, se não fundamental, no controle local do parasita. No momento, desconhecemos se estas populações auxiliam na eliminação local do *T. cruzi* sinalizando a presença do parasita e respondendo positivamente às

citocinas produzidas sistêmica ou localmente, ou se constituem locais relativamente imunoprivilegiados, onde o parasita poderia passar despercebido. De qualquer forma, eventuais falhas na provisão de ajuda pelas células estruturais poderiam contribuir no escape local do parasita.

Uma das principais citocinas produzidas no curso da resposta imune ao *T. cruzi* é o IFN- γ . Esta citocina é induzida em diversas populações linfocitárias como resultado de uma sequência de eventos que segue ao reconhecimento de Padrões Moleculares (PAMPs) do *T. cruzi* por Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs) nas células dendríticas e macrófagos, tais como Glicosilfosfatidil-inositol (GPI) reconhecidos por *Toll-like receptors* (TLR) 2/6, fosfolípídeos-glicoinositol (GPIs) reconhecidos por homodímeros de TLR4 e, sequências CpG de DNA metiladas do parasita reconhecidas por homodímeros de TLR9. Esses reconhecimentos geram sinalização via Myd88 e TRIF, culminando direta ou indiretamente na produção de IFN- γ , entre outras citocinas (Bafica et al., 2006). Em se tratando de quadros crônicos, níveis aumentados de IFN- γ se tornam constantes uma vez que as células do sistema imune estão em contínua ativação, seguindo o curso normal da resposta (Junqueira et al., 2010).

Estudos mostraram que a produção de mediadores inflamatórios é mais rápida quando monócitos são tratados com IFN- γ antes de um desafio imunológico por lipopolissacarídeo (LPS) (Hayes et al., 1995). A presença de IFN- γ no microambiente não leva *per se* à ativação das células em questão, mas sim a uma resposta mais rápida e forte aos estímulos via PRRs (Hu et al., 2008). Este processo é conhecido como *priming* (Hayes et al., 1995). Por outro lado, enquanto este fenômeno é claro nas populações da estirpe monocitária, desconhecemos sua importância *in vivo* sobre as populações estruturais do coração. Deste modo, o estudo da influência do IFN- γ como agente de *priming* em células cardíacas estruturais, bem como o papel destas últimas no combate ou encobrimento da infecção por *T. cruzi* constitui um alvo de estudo importante para o melhor entendimento da relação parasita/hospedeiro.

A verificação *in vivo* do processo de *priming* no tecido cardíaco usando o próprio *T. cruzi* se mostra, entretanto, inviável. A infecção direta do coração por inoculação intracardíaca do parasita é incerta, sendo este um órgão de extrema movimentação. Ainda, o inóculo *in loco*, mesmo que com alta perícia, causaria grande dano estrutural, gerando uma resposta inflamatória ainda maior e interferiria nos resultados. Em uma

infecção sistêmica, não haveria a certeza de que as células cardíacas foram infectadas, uma vez que o tropismo tissular do parasito se dá pela interação das características referentes ao parasito (Henao-Martinez et al., 2012) e ao hospedeiro (Alvarez et al., 2014; Marinho et al., 2004). Outro fator relevante é que o *priming* com IFN- γ faria com que a nível sistêmico as células da imunidade inata causariam uma resposta mais efetiva na eliminação dos parasitas, gerando a possibilidade do animal não chegar sequer a desenvolver alguma patologia cardíaca. Por outro lado, o estudo da infecção em camundongos IFN- γ KO ou IFN- γ RKO, levaria a um aumento drástico da carga parasitaria sistêmica que afetaria secundariamente a carga parasitária local no tecido cardíaco (Marinho et al., 2007).

Desse modo, faz-se necessário um modelo minimalista mais confiável para a análise da resposta do coração ao *priming* por IFN- γ . Visando este objetivo, no presente trabalho verificamos o efeito do *priming* por IFN- γ sobre a resposta *in vivo* do tecido cardíaco ao desafio intravenoso com LPS. Em um segundo grupo de experimentos, para confirmar a participação dos cardiomiócitos no *priming*, foi estudada a resposta *in vitro* a IFN- γ /LPS de cardiomiócitos tumorais HL-1.

1.1 Justificativa

O estudo da resposta imune do coração na presença de uma concentração constante de IFN- γ poderá ampliar a nossa compreensão do papel das células cardíacas no controle da infecção crônica pelo *T. cruzi*. Assim, o fenótipo obtido com o modelo experimental minimalista fez-se necessário para verificar se existe uma atividade moduladora sobre a atividade imunológica dos cardiomiócitos e outras populações estruturais do coração. O trabalho deixa também margem para a investigação do efeito de outras citocinas em circunstâncias semelhantes a proposta, tal como IL-6 e TNF- α .

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho é determinar se a resposta de sinalização celular emitida por células estruturais do coração é alterada quando o organismo passa por um processo de *priming* sistêmico por IFN- γ .

2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar se há variação na expressão de citocinas pelas células estruturais do coração quando submetidos ao *priming* sistêmico por IFN- γ e subsequente desafio subletal por LPS;
- b) Determinar se há variação nos níveis de citocinas liberadas na corrente sanguínea pelo desafio subletal com LPS é alterada pelo *priming* sistêmico por IFN- γ ;
- c) Determinar se os cardiomiócitos são responsáveis pela eventual imunomodulação do IFN- γ sobre a resposta do tecido cardíaco.

3.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos descritos no presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob Protocolo nº 82, folha 21 do livro 03.

3.2 Animais

Camundongos C3H/HePas foram adquiridos, mantidos e manipulados de acordo com as normas do CEUA no biotério do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo – *campus* Capital.

3.3 Células

Cardiomiócitos tumorais HL-1 (Claycomb et al., 1998) foram gentilmente cedidas pela Prof.^a Dr.^a. Alicia Juliana Kowaltowski do Instituto de Química da Universidade de São Paulo – *campus* Capital. As células foram mantidas em garrafas de cultura de 75 cm² com meio de cultura Claycomb (Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, MO, Estados unidos), suplementados com 4% de Soro Fetal Bovino, 0,1 mM de noradrenalina, 2 mM de L-glutamina, 0,1 u/ml de penicilina e 0,1 µg/ml de estroptomicina.

3.4 Ensaios *in vitro*

3.4.1 *Curva de produção de citocinas frente ao desafio de LPS*

Para determinar os picos das citocinas produzidas na condição de cultura de células cardíacas, 10⁵ células foram plaqueadas em placa de 48 poços. Foram aplicadas três concentrações diferentes de LPS (0,1, 1 ou 10 µg/ml). No grupo controle, foi administrado apenas meio de cultura. Após o tempo de observação (1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 ou 72 h), o sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas. Os grupos controles foram tratados apenas com o meio de cultura.

3.4.2 *Efeito do priming com IFN- γ em condição similar a um quadro agudo de infecção cardíaca pelo T. cruzi*

Células HL-1 foram cultivadas em placas de 48 poços (10⁵/poço). IFN- γ foi administrado em três concentrações diferentes (0,2, 1 ou 5 ng/ml). Após 24 h, os poços foram lavados 3 vezes com PBS, seguido do desafio com LPS em duas

concentrações (1 ou 10 µg/ml). Os grupos controles foram tratados apenas com meio de cultura. O sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas nos tempos de 2, 8, 12 e 24 h.

3.4.3 Efeito do priming com IFN- γ em condição similar a um quadro de C.C.C.

Células HL-1 foram cultivadas em garrafas de 75 cm² com IFN- γ a 1 ng/ml por 120 h. Após esse prazo, as células foram transferidas para placas de 48 poços (10⁵/poço) em meio com IFN- γ . 24 h depois, foram lavadas 3 vezes com PBS e desafiadas com LPS em 2 concentrações (1 ou 10 µg/ml). Nos grupos controles, as células foram tratadas apenas com meio de cultura. O sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas nos tempos de 2, 8, 12 e 24 h após o tratamento com LPS.

3.5 Ensaio *in vivo*

3.5.1 Ensaio com priming com IFN- γ simulando um quadro agudo de infecção cardíaca pelo *T. cruzi*

Para analisar o efeito do priming com IFN- γ simulando um quadro agudo de comprometimento cardíaco causado pelo *T. cruzi*, foi aplicada uma dose única de IFN- γ a 10 µg/kg em 200 µl (i.v.) em animais C3H/HePas (4-6 semanas). Após 24 h da aplicação de IFN- γ , foi inoculado LPS a 4,5 mg/kg em 200 µl (i.p.). Aos grupos controle, tanto para IFN- γ quanto para LPS, foram administrados PBS nos mesmos volumes. Após 3 h, sangue foi coletado, bem como fígado, baço e coração (após perfusão), para dosagem de citocinas.

3.5.2 Ensaio de priming com IFN- γ simulando um quadro crônico de Cardiomiopatia Chagásica Crônica (C.C.C.)

Na simulação de estado crônico sintomático da Doença de Chagas com CCC, foram aplicadas 4 doses de IFN- γ (Preprotech, Ribeirão Preto, SP, Brasil) a 15 ng/kg em 200 µl (i.v.) por 6 dias, com intervalo de 48 h entre cada uma em animais C3H/HePas (8-12 semanas). Depois de 24 h da última aplicação de IFN- γ , foi aplicado LPS (de *Escherichia coli*, sorotipo 0111:B4, Sigma) a 4,5 mg/kg em 200 µl (i.p.). Aos grupos controle, tanto para IFN- γ quanto para LPS, foram administrados PBS nos

mesmos volumes. Após 3 ou 8 h, sangue foi coletado, bem como fígado, baço e coração (após perfusão), para dosagem de citocinas.

3.5.3 Curva de produção de citocinas frente ao desafio de LPS

Para saber quais e onde eram os picos das citocinas produzidas com desafio de LPS, foi aplicado LPS a 4,5 mg/kg em 200 μ l (i.p.) em animais C3H/HePas (6-8 semanas). Nos tempos de eutanásia (8, 12, 24 e 48 h), sangue foi coletado, bem como fígado, baço e coração (após perfusão), para dosagem de citocinas.

3.6 Dosagem de citocinas

3.6.1 Sangue

Após a coleta, o sangue dos animais foi armazenado em geladeira por uma hora e centrifugados por 10 minutos a 4 °C e 3000 rpm para a obtenção do soro.

3.6.2 Órgãos

Fígado, baço e coração foram pesados e macerados em PBS ou em solução de inibidor de protease (P8340, Sigma) na proporção de 1 μ l a cada 0,1 mg de órgão. O macerado foi centrifugado por 10 min a 4 °C e 13000 rpm para a coleta do sobrenadante.

3.6.3 Kits de ELISA para dosagem de citocinas

As citocinas do soro, do sobrenadante do macerado dos órgãos e do sobrenadante das culturas foram dosadas de acordo com protocolo do fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA, Estados Unidos) para IL-10, IL-1 β e eBiosciences (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Estados Unidos) para TNF- α e IL-6).

3.6.4 Quantificação de mRNA de citocinas

A quantificação relativa de mRNA de TNF- α e IL-6 foi realizada por ensaio de qRT-PCR. Porções dos órgãos previamente perfundidos foram congelados com nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C. Em tempo hábil, os órgãos foram macerados em nitrogênio líquido e a extração do RNA total foi feita com o Kit

RNeasy® (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) de acordo com o protocolo do fabricante. Um micrograma de RNA total foi convertido em cDNA (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) de acordo com as especificações do fabricante. A expressão foi quantificada por qRT-PCR utilizando-se o ensaio Platinum® SYBR® Green (Invitrogen) e 4pmol/µl de “primers” específicos para o gene de IL-6 (F-RT2-II6- 5' ATGGATGCTACCAAAGTGGAT 3' e R-RT2-II6- 5' TGAAGGACTCTGGCTTTGTCT 3') e TNF- α (R-RT2-Tnfa- 5' TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC 3' e F-RT2-Tnfa- 5' CATCTTCTCAAATCGAGTGACAA 3'). A quantificação do cDNA específico do parasita foi realizada usando o equipamento e software ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

3.6.5 Quantificação de citocinas/quimiocinas via Multiplex

Para a dosagem de Eotaxina, RANTES, TNF- α , VEGF, GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IP-10, KC, LIF, LIX, MCP-1, M-CSF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2 e G-CSF, foi utilizado o kit Milliplex®map (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos), compatível com amostras de sobrenadante de cultura e homogenato de órgãos, seguindo o protocolo do fabricante.

3.7 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados com métodos Two-way ANOVA e o Teste de Bonferroni como *post test* ou One-way ANOVA e Tukey como *post test*, executados pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos) versão 6.01.

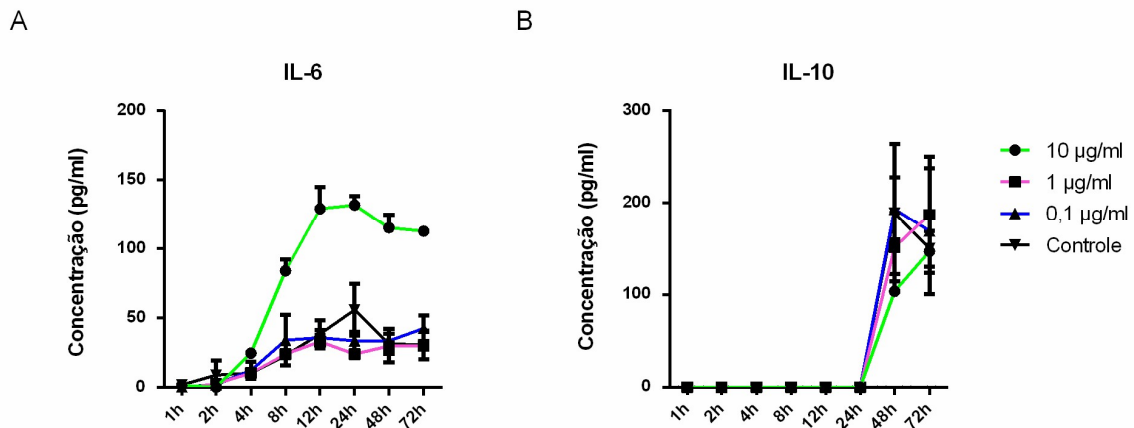
Os experimentos deste trabalho visam reproduzir eventos de infecção aguda e crônica por *Trypanosoma cruzi* no coração, tal qual ocorre na Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC). Nesta infecção, a ativação de células CD4⁺ Th1, CD8⁺ e *Natural Killer* resulta na produção de IFN- γ , citocina que tem efeito local e/ou sistêmico (Chow et al., 2014; Murray, 1988). Assim, caso o coração, e mais especificamente os cardiomiócitos, respondam a esta citocina, este órgão poderá deixar de ser considerado exclusivamente passivo em relação a resposta imune (Lin, Knowlton, 2014).

4.1 Experimentos *in vitro* Células cardíacas, como as da linhagem HL-1, ativam NF- κ B quando estimuladas com agonistas de TLR4 (Boyd et al., 2006). Este fator de transcrição é comum para uma variedade de Receptores do tipo Toll (TLR) e é responsável pela expressão gênica de citocinas inflamatórias, como a IL-6 e IL-10. Essa característica faz com que o coração seja capaz de iniciar e regular a resposta inflamatória local (Boyd et al., 2006; Brown, Jones, 2004).

A fim de verificar a sensibilidade de células cardíacas ao LPS, foi realizado um estudo cinético com cardiomiócitos imortalizados da linhagem HL-1 para determinar as curvas de produção de citocinas após estímulo com o mesmo (0,1, 1 ou 10 μ g/ml). As células foram acompanhadas pelo período de até 72h, e os sobrenadantes coletados em diferentes tempos para análise de citocinas (ELISA).

No experimento de cinética e dose-resposta ao LPS nas células HL-1, a produção de IL-6 é mais evidente com a dose de 10 μ g/ml de LPS, e essa produção destaca a partir de 4h após o tratamento, sendo regulada a partir das 24h. Já a produção de IL-10 por células HL-1 se apresenta nula ou muito baixa até as 24h, passando a ser detectável pela técnica de ELISA a partir deste tempo (Fig. 1). Nesta experiência não foi observada produção de TNF- α ou IL-1 β (dados não mostrados).

Figura 1 - Produção de IL-6 e IL-10 por células HL-1 quando passam por desafio de LPS.

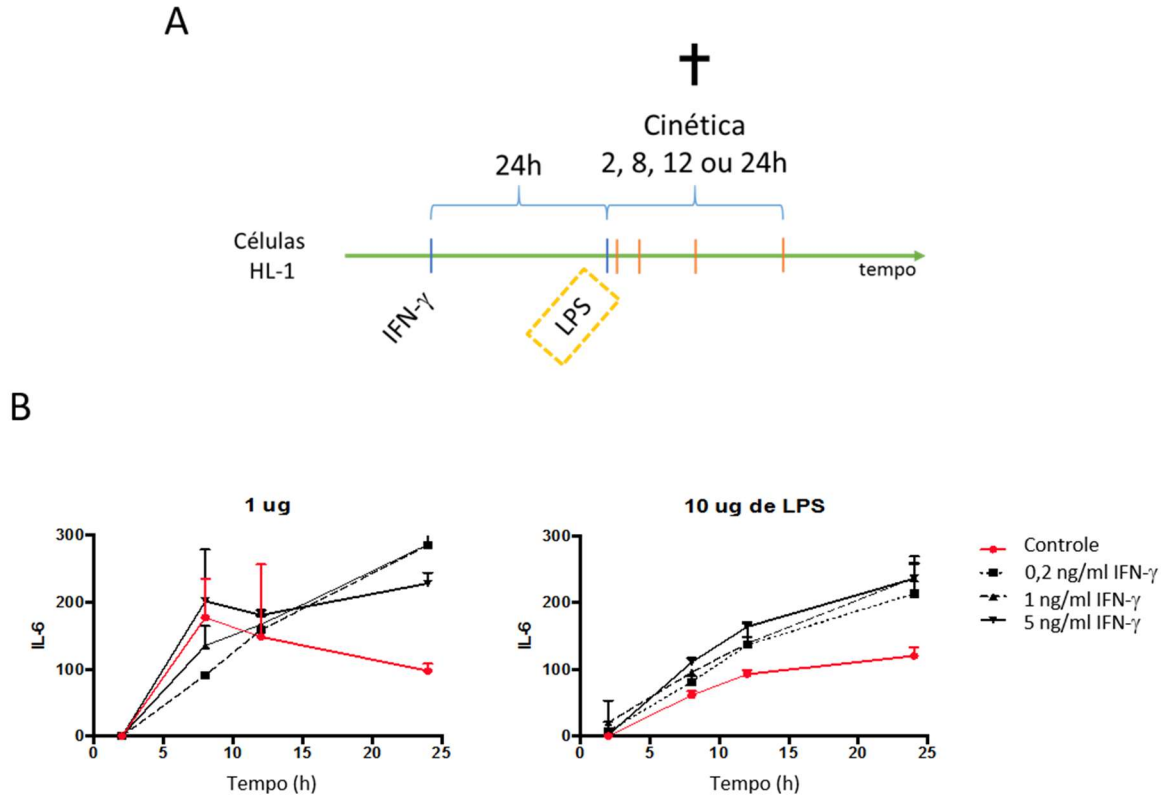


Células foram mantidas em cultura (meio Claycomb, 4% SFB). Desafio de LPS feito em três concentrações diferentes (0,1, 1 ou 10 µg/ml). O sobrenadante foi coletado nos tempos de 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 h para a dosagem e citocinas (ELISA). A, B. Dosagem de IL-6 e IL-10, respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado (n=3). *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001.

Sabendo que um bom desempenho na produção de IL-6 ocorre com 10µg/ml de LPS, os experimentos seguintes foram desenhados no sentido de identificar se há diferença na produção de citocinas quando esta dose de LPS é utilizada em células HL-1 que foram primadas com IFN- γ . Além disso, uma dose menor de LPS, de 1µg/ml, foi também utilizada para verificar se o IFN- γ poderia potencializar a resposta das células a uma dose sub-ótima.

Células foram tratadas com três concentrações diferentes de IFN- γ (0,2, 1 ou 5 ng/ml) 24h antes do desafio com LPS (1 ou 10 µg/ml). O sobrenadante das células foi coletado nos tempos de 2, 8, 12 ou 24 h para dosagem de citocinas (ELISA). Nesta experiência, não foi observada produção de IL-10 nos tempos em questão. Em contrapartida, a produção de IL-6 foi similar nas duas concentrações de LPS, ambas acima da observada nos grupos controles (Fig. 2), evidenciando a função do IFN- γ de potencializar a resposta, e de forma dose-independente, uma vez que a sua concentração pouco influenciou na quantidade de IL-6 produzida (Fig. 2). Mais ainda, como na experiência anteriormente citada, não foi observada a produção de TNF- α (dados não mostrados).

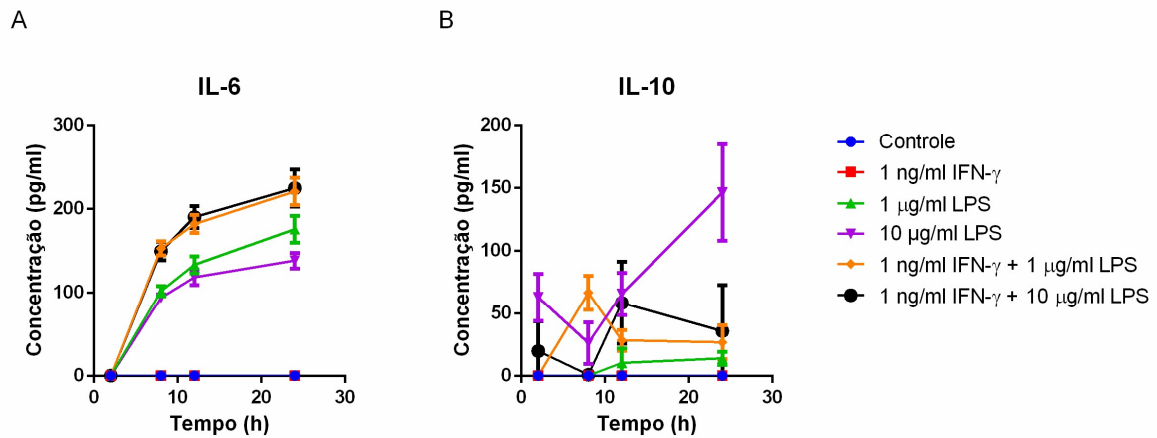
Figura 2 - Produção de IL-6 por células HL-1 primadas com IFN- γ quando passam por desafio de LPS.



Células foram mantidas em cultura (meio Claycomb, 4% SFB). O *priming* com IFN- γ foi feito em 3 concentrações diferentes (0,2, 1 ou 5 ng/ml) e 24 h antes do desafio com LPS. Desafio de LPS feito com duas concentrações diferentes (1 ou 10 μ g/ml). O sobrenadante foi coletado nos tempos de 2, 8, 12 e 24 h para a dosagem de citocinas (ELISA). B, C. Dosagem de IL-6 no desafio de 1 e 10 μ g/ml, respectivamente.

Na oportunidade, repetimos o experimento com *priming* de IFN- γ por 24 h, agora apenas com uma dose de IFN- γ (Fig. 3) para a obtenção de uma produção de citocinas mais precisa.

Figura 3 - Produção de IL-6 e IL-10 por células HL-1 primadas com IFN- γ quando passam por desafio de LPS.

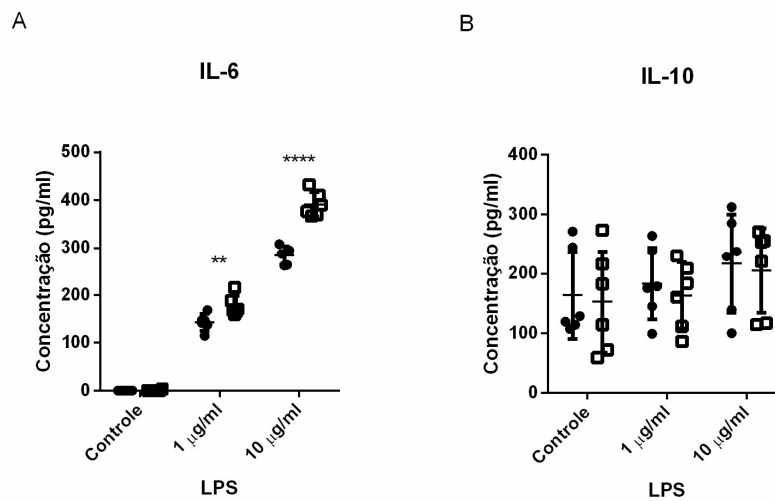


Células foram mantidas em cultura (meio Claycomb, 4% SFB). O *priming* com IFN- γ foi feito na concentração de 1 ng/ml e 24 h antes do desafio com LPS. Desafio de LPS feito na concentração de 1 ou 10 μ g/ml. O sobrenadante foi coletado nos tempos de 2, 8, 12 e 24 h para a dosagem de citocinas (ELISA) (Fig. 2 A). A. e B. Dosagem de IL-6 e IL-10, respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado (n=6).

Analisamos por ELISA a produção de IL-6, IL-10 e TNF- α . Nossos dados evidenciam que novamente não houve produção de TNF- α pela cultura no experimento com *priming* de 24 h de IFN- γ (dados não mostrados) e que as dosagens de IL-10 não foram conclusivas (Fig. 3A). Observamos novamente que, de acordo com as dosagens de IFN- γ e/ou LPS e entre os tempos observados, a produção de IL-6 é mais evidente no tempo de 24 h. Ainda, o estímulo por IFN- γ por si não desencadeia produção desta citocina.

Assim, realizamos novamente o mesmo experimento por três réplicas independentes, mas destacando apenas o prazo de 24 h após o desafio de LPS, para análise de IL-6, IL-10 e TNF- α por ELISA.

Figura 4 - Produção de IL-6 e IL-10 por células HL-1 primadas com IFN- γ 24 h após passarem por desafio de LPS.



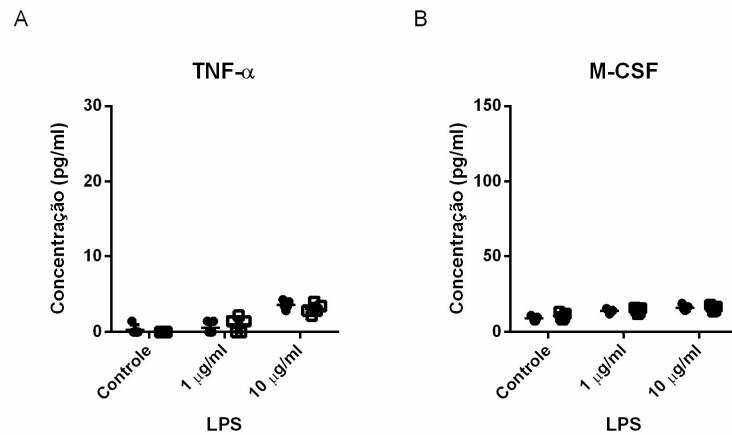
Células foram mantidas em cultura (meio Claycomb, 4% SFB). O *priming* com IFN- γ foi feito na concentração de 1 ng/ml e 24 h antes do desafio com LPS. Desafio de LPS feito na concentração de 1 ou 10 μ g/ml. O sobrenadante foi coletado 24 h após o desafio de LPS para a dosagem de citocinas (ELISA). A. e B. Dosagem de IL-6 e IL-10, respectivamente. Dados representativos de três experimentos realizados (n=6). * Representa diferença significativa entre cada dose de LPS para os grupos tratados e não tratados por IFN- γ , onde * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Observamos que não houve produção de TNF- α (dados não mostrados), e que, em relação a IL-10, os dados observados são inconclusivos (Fig. 4B), tal qual demonstrado em nossos experimentos anteriores.

Já em relação a IL-6, em forma análoga ao mostrado na figura 3, observa-se que o estímulo por IFN- γ por si não desencadeia produção da mesma. Em contrapartida, *priming* por 24h com IFN- γ potencializa a produção da citocina em resposta ao LPS, e esse aumento na produção em relação aos grupos tratados apenas com LPS é dose dependente (Fig. 4A).

Afim de determinar melhor o padrão de citocinas expresso nas condições propostas pelo experimento, foi realizado um Milliplex das amostras do mesmo experimento. Foram analisadas as seguintes citocinas: Eotaxina, RANTES, TNF- α , VEGF, GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IP-10, KC, LIF, LIX, MCP-1, M-CSF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2 e G-CSF, todas relacionadas a resposta imune inata.

Figura 5 - Produção de TNF- α e M-CSF por células HL-1 primadas com IFN- γ 24 h após passarem por desafio de LPS.

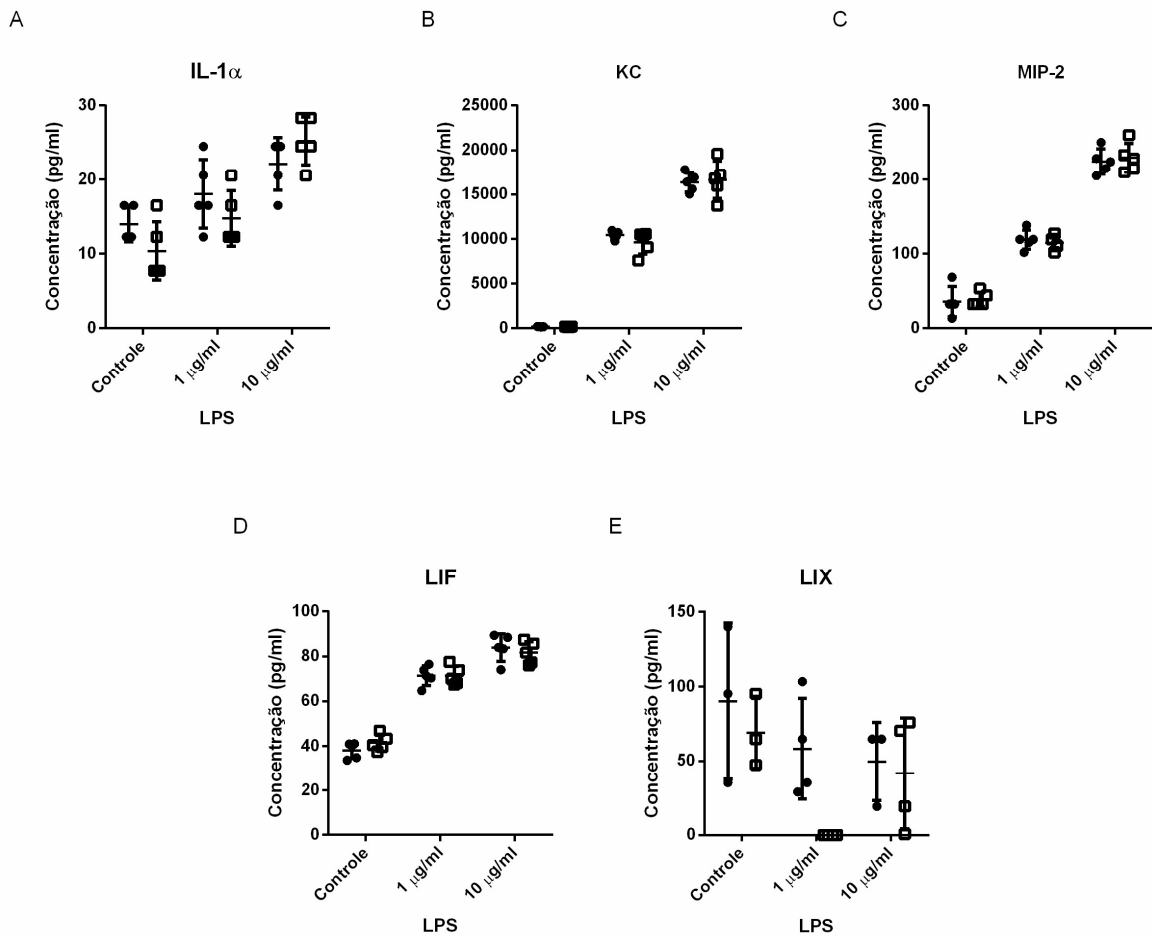


Células foram mantidas em cultura (meio Claycomb, 4% SFB). O *priming* com IFN- γ foi feito na concentração de 1 ng/ml e 24 h antes do desafio com LPS. Desafio de LPS feito na concentração de 10 μ g/ml. O sobrenadante foi coletado 24 h após o desafio de LPS para a dosagem de citocinas (Miliplex). A. e B. Dosagem de TNF- α e M-CSF, respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado (n=5). * Representa diferença significativa entre cada dose de LPS para os grupos tratados e não tratados por IFN- γ , onde *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001.

Os dados mostram que as concentrações de eotaxina, MIP-1 α , MIP-1 β e IL-1 β presentes nas amostras eram muito baixas para serem detectadas pelo Miliplex (dados não mostrados). Quase similar a essas concentrações, M-CSF e TNF- α mostraram produções baixas em todas as situações experimentais e quase próximas de zero (Figs. 5A e 5B). Vale ressaltar que, embora a técnica foi mais sensível e capaz de determinar a concentração de TNF- α das amostras, ela é muito baixa, tendendo a zero. Isso corrobora com os nossos dados anteriores de ELISA, os quais reafirmam que os cardiomiócitos HL-1, nessas condições, não produzem TNF- α em quantidades significativas.

Os mesmos tratamentos foram capazes de induzir a produção de IL-1 α (Fig. 6A) e LIX (CXCL5) (Fig. 6E) difusas entre suas replicatas, sendo inconclusivas, portanto.

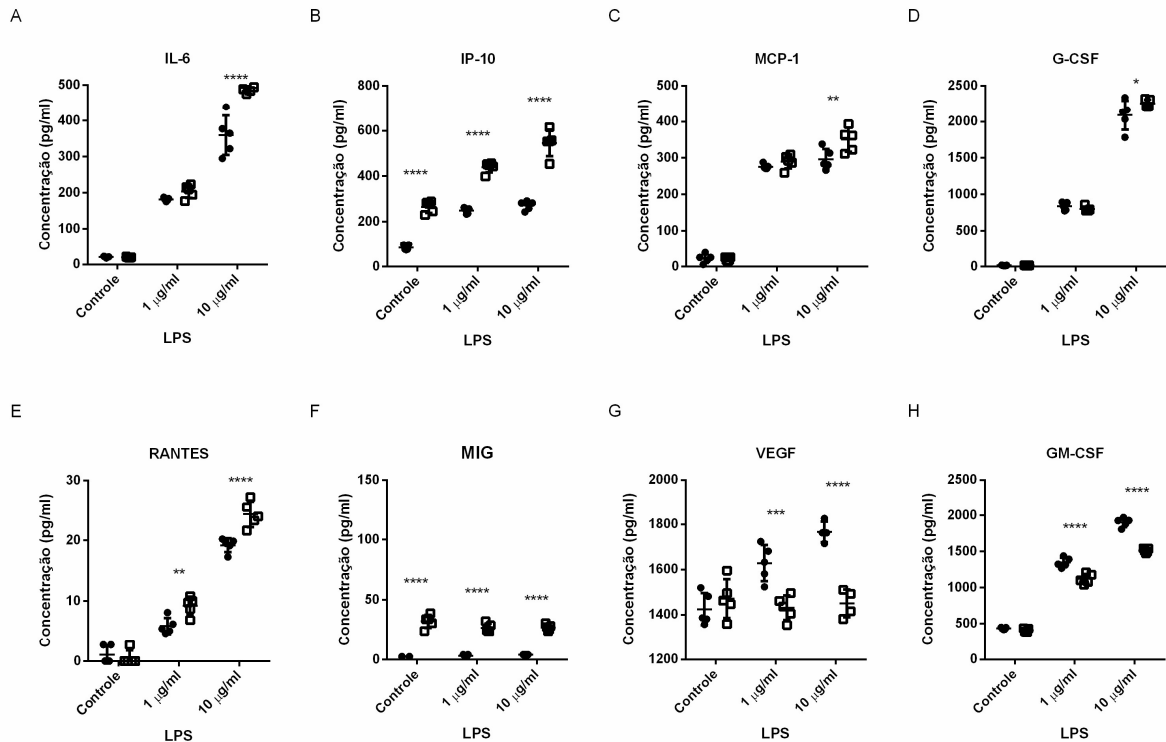
Figura 6 - Produção de IL-1 α , KC, MIP-2, LIF e LIX por células HL-1 primadas com IFN- γ 24 h após passarem por desafio de LPS.



Células foram mantidas em cultura (meio Claycomb, 4% SFB). O *priming* com IFN- γ foi feito na concentração de 1 ng/ml e 24 h antes do desafio com LPS. Desafio de LPS feito na concentração de 10 μ g/ml. O sobrenadante foi coletado 24 h após o desafio de LPS para a dosagem de citocinas (Miliplex). A, B, C e D. Dosagem de IL-1 α , KC, MIP-2, LIF e LIX, respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado (n=5). * Representa diferença significativa entre cada dose de LPS para os grupos tratados e não tratados por IFN- γ , onde *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001 **** p<0,0001.

Também com produções detectáveis, as concentrações de KC, MIP-2 e LIF aumentam de maneira dose dependente de LPS, sem sofrer ação de *priming* por IFN- γ (Figs. 6B, 6C e 6D, respectivamente).

Figura 7 - Produção de IL-6, IP-10, MCP-1, G-CSF, RANTES, MIG, VEGF e GM-CSF por células HL-1 primadas com IFN- γ 24h após passarem por desafio de LPS.

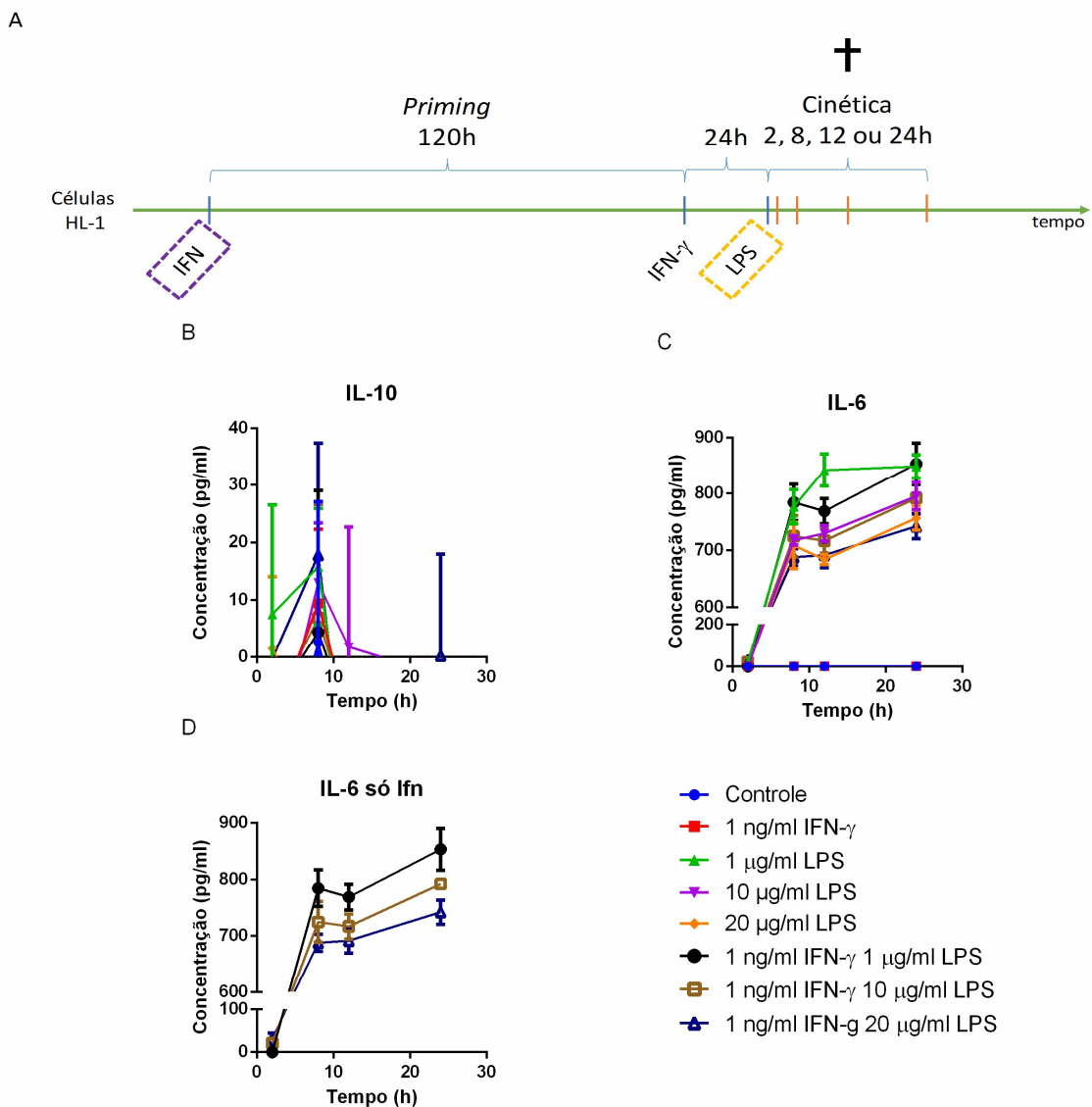


Células foram mantidas em cultura (meio Claycomb, 4% SFB). O *priming* com IFN- γ foi feito na concentração de 1 ng/ml e 24 h antes do desafio com LPS. Desafio de LPS feito na concentração de 10 μ g/ml. O sobrenadante foi coletado 24 h após o desafio de LPS para a dosagem de citocinas (Miliplex). A, B, C e D. Dosagem de IL-6, IP-10, MCP-1, G-CSF, RANTES, MIG, VEGF e GM-CSF, respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado (n=5). * Representa diferença significativa entre cada dose de LPS para os grupos tratados e não tratados por IFN- γ , onde * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$

A ação de *priming* por IFN- γ ocorreu para as citocinas IL-6, IP-10, MCP-1, G-CSF e RANTES (Fig. 7A a 7E, respectivamente) de modo que a produção das mesmas foram “up”-reguladas nos grupos tratados previamente com IFN- γ . Vale destacar que IL-6 reproduziu as nossas análises anteriores por ELISA. Além disso, a ação de IFN- γ por si só afeta diretamente a produção de MIG (Fig. 7F), sendo que o LPS não tem ação sobre a mesma. Ainda sobre a ação de *priming*, o IFN- γ induziu a “down”-regulação de VEGF e GM-CSF (Fig. 7G e 7H).

Para simular o quadro crônico de C.C.C., foi realizado um experimento onde o *priming* por IFN- γ foi simulado por 120 h *in vitro*, seguidos de desafio de LPS.

Figura 8 - Produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 por células HL-1 primadas com IFN- γ quando passam por desafio de LPS.



A. Células foram mantidas em cultura (meio Claycomb, 4% SFB). O *priming* com IFN- γ foi feito na concentração de 1 ng/ml na cultura celular por 120h, sendo trocado o meio a cada 48h. Desafio de LPS feito na concentração de 1, 10 ou 20 μ g/ml. O sobrenadante foi coletado nos tempos de 2, 8, 12 e 24 h para a dosagem de citocinas (ELISA). B e C. Dosagem de IL-10 e IL-6, respectivamente. D. Ênfase na produção de IL-6 pelos grupos primados com IFN- γ . Dados representativos de três experimentos realizados (n=6).

Os resultados apontam produção de IL-10 (Fig. 8B) difusa e inconclusiva, além de produção de TNF- α muito baixa ou nula (dados não mostrados).

Em relação a IL-6, na experiência mostrada nas figuras 8C e 8D, a produção desta citocina quando os grupos foram tratados com IFN- γ por 120 h e desafiados com LPS não revelou qualquer efeito de *priming* positivo ou negativo em relação aos

grupos não tratados com IFN- γ . Por outro lado, uma correlação inversa entre a dose de LPS utilizada e o aumento da produção da citocina foi observada (Fig. 8C e 8D). Contudo, embora outro experimento apresente uma tendência a esse mesmo resultado, não podemos tomar como verdade tal fato.

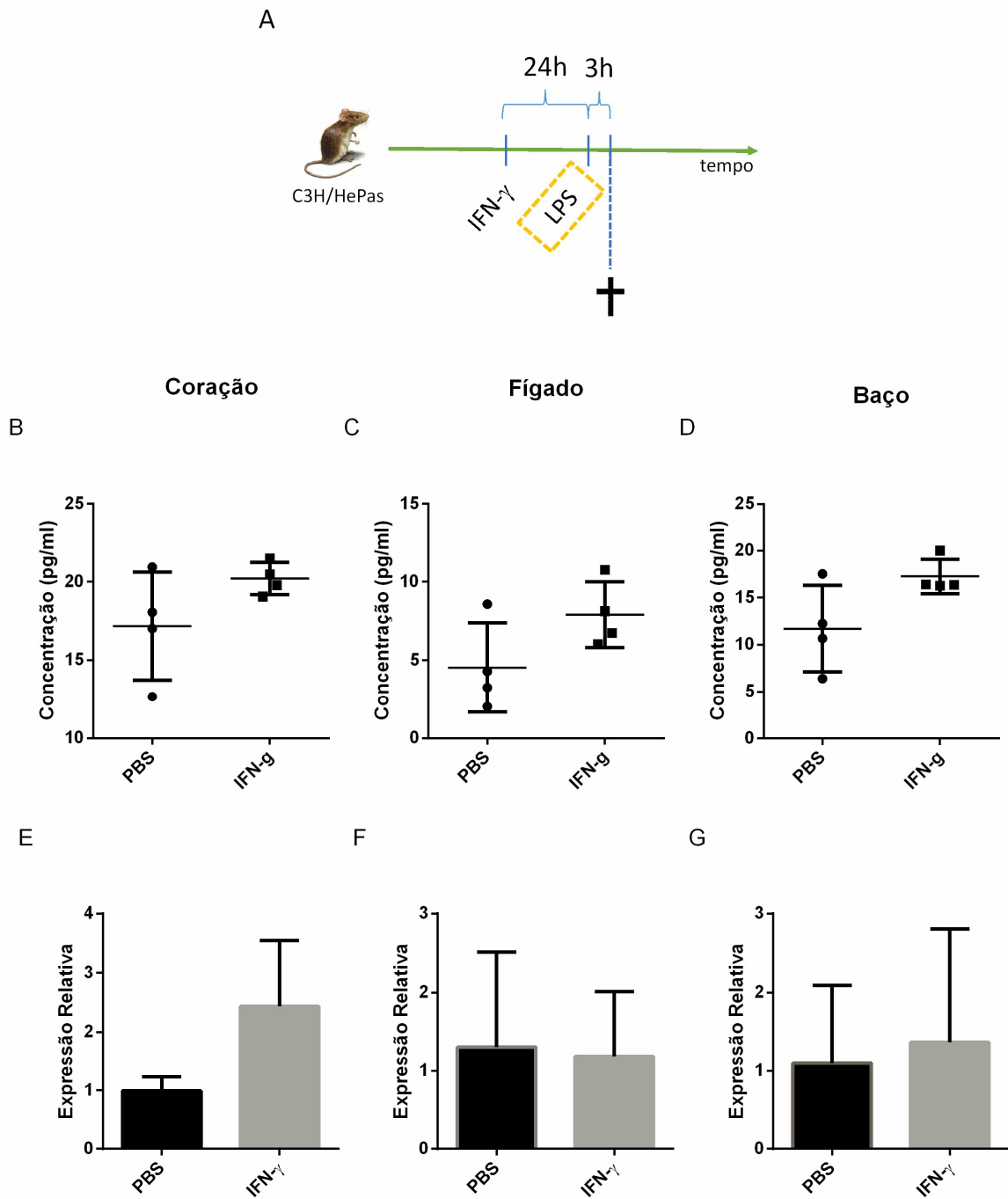
4.2 Experimentos *in vivo*

Os experimentos que seguem foram realizados para verificar se o padrão de citocinas encontrados no nosso modelo *in vitro* corresponde ao padrão *in vivo*.

Em um primeiro grupo de experiências *in vivo* avaliamos a resposta do coração a LPS após *priming* com uma dose elevada de IFN- γ , protocolo que, em função da dose utilizada, representa uma condição aguda de infecção por *T. cruzi*. Nestas experiências, camundongos C3H/HePas foram estimulados com dose única de IFN- γ na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ (i.v., 200 μl) e, 24 h depois, desafiados com LPS (i.p.; 4,5 mg/kg, 200 μl). Após 3 h, os animais foram submetidos à eutanásia e o material biológico (sangue, baço, coração e fígado), coletados para dosagem de citocinas (ELISA e qPCR).

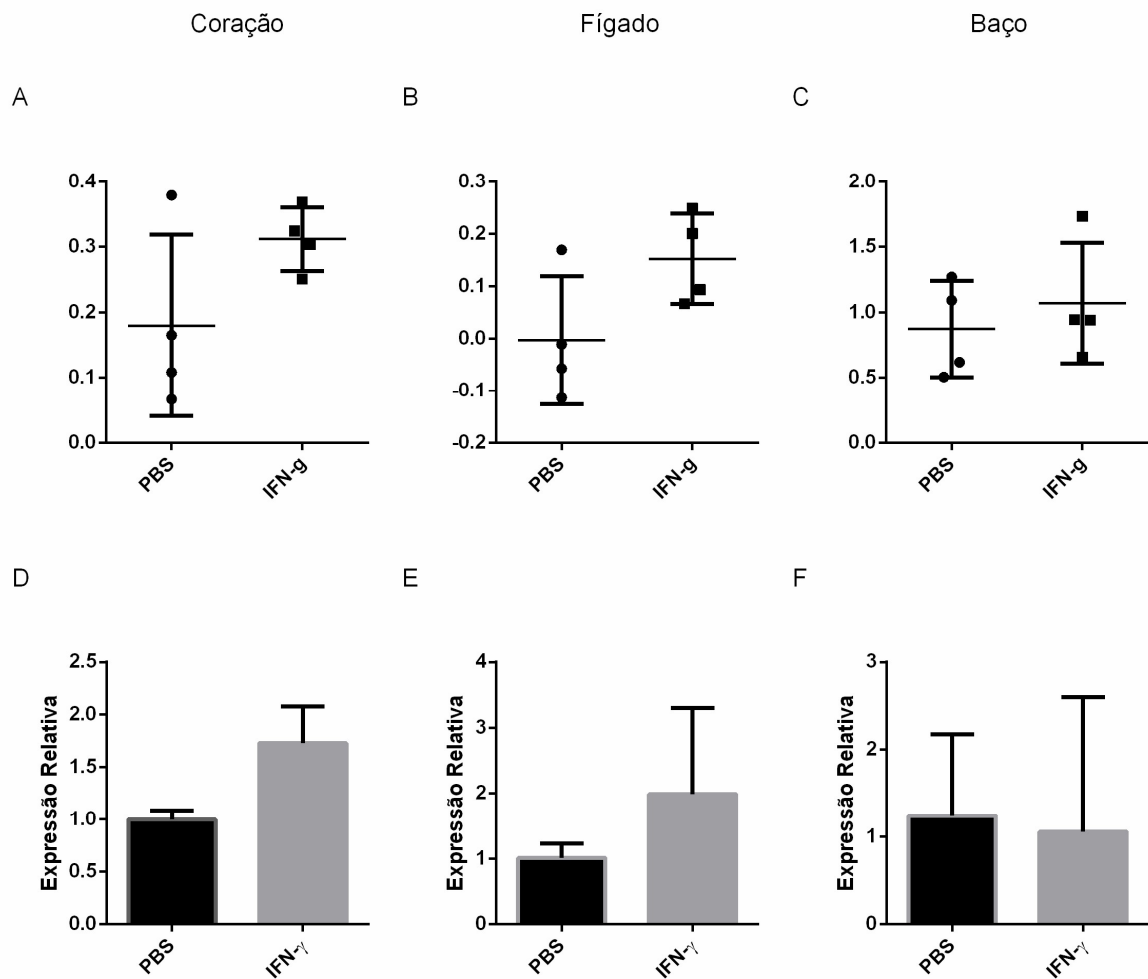
Em uma experiência preliminar com este protocolo observamos que no coração o estímulo com dose alta de IFN- γ determina um discreto aumento, que não atinge significância, na produção e transcrição de IL-6 e TNF- α induzidas por LPS, (Fig. 9 e 10). No fígado, um aumento discreto e não significativo na produção e transcrição de TNF- α é também observado, o que não ocorre no baço. De forma geral, os dados de PCR quantitativa corroboraram com os de ELISA. Além disso, no sangue, foi também observado que o *priming* com IFN- γ promove um aumento na produção de TNF- α em resposta ao LPS (Fig. 11).

Figura 9 - Produção de IL-6 após dose alta de IFN- γ e desafio de LPS.



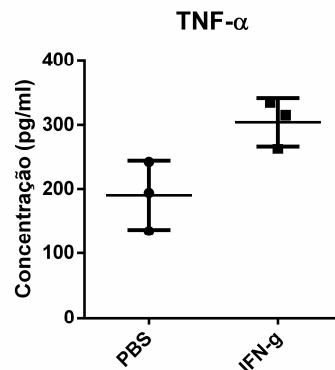
A. Esquema cronológico do experimento. Animais C3H/HePas foram tratados com IFN- γ em uma única dose. Foi feito um desafio de LPS 24 h depois do tratamento com IFN- γ . Os animais passaram por perfusão, órgãos, coletados, pesados e parte deles, macerados. O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (ELISA). A outra porção do órgão foi separada para qPCR de IL-6. B, C, D. Dosagem de IL-6 no coração, fígado e baço, respectivamente. E, F, G. Expressão relativa de mRNA para IL-6 no coração, fígado e baço, respectivamente. Dados de um experimento realizado (n=4). *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001.

Figura 10 - Produção de TNF- α após dose alta de IFN- γ e desafio de LPS.



Animais C3H/HePas foram tratados com IFN- γ em uma única dose. Foi feito um desafio de LPS 24 h depois do tratamento com IFN- γ . Às 3 h do desafio os animais passaram por sacrifício e perfusão, os órgãos, coletados, pesados e parte deles, macerados. O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (ELISA). A outra porção do órgão foi separada para qPCR para TNF- α (Fig. 9A). A, B, C. Dosagem de TNF- α no coração, fígado e baço, respectivamente. D, E, F. Expressão relativa de mRNA para TNF- α no coração, fígado e baço, respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado (n=4). *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001.

Figura 11 - Dosagem de TNF- α do soro de animais C3H/HePas tratados com dose alta de IFN- γ e desafiados com LPS.



Animais C3H/HePas foram tratados com IFN- γ em uma única dose. Foi feito um desafio de LPS 24 h depois do tratamento com IFN- γ (Fig. 9A). O sangue foi coletado para a separação do soro. Dados representativos de um experimento realizado (n=4). *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001.

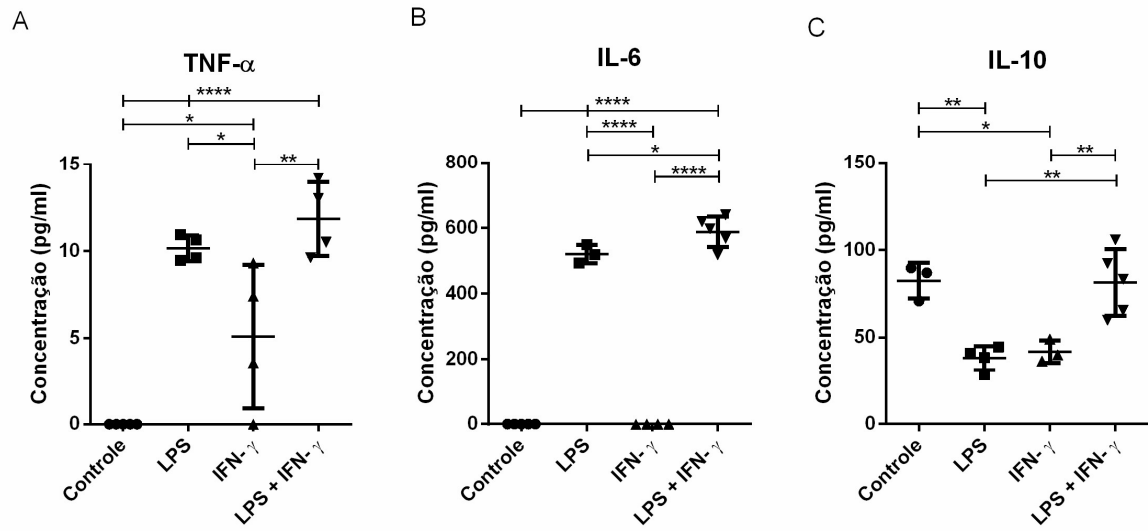
Para confirmar os resultados preliminares acima, um experimento análogo foi realizado com um grupo amostral maior e incluindo os devidos grupos controles (Figs. 12, 13, 14 e 15). Nesse experimento, foi incluída ainda a análise da produção de IL-10.

Os resultados obtidos demonstram que a produção de IL-6 no coração do grupo estimulado com IFN- γ e LPS é significativamente maior do que nos demais grupos (Fig. 12B), apesar da diferença com o grupo estimulado unicamente com LPS ser pequena, repetindo o perfil encontrado no experimento anterior, no qual a diferença não era significativa (Fig. 9B). Já a dosagem de TNF- α não demonstrou diferença entre os grupos primado e não primado com IFN- γ (Fig. 12A). Por outro lado, a produção de IL-10 no coração apresentou níveis maiores no grupo controle e no grupo primado com IFN- γ e desafiado com LPS, sendo a menor produção encontrada nos grupos tratados somente com LPS, ou com IFN- γ (Fig. 12C).

Já no fígado, a dosagem de IL-6 revelou que a produção desta citocina foi equivalente entre os grupos estimulados com LPS, primados ou não com IFN- γ , porém maiores do que os dos grupos controles (Fig. 13B). Em relação a produção de IL-10, todos os grupos apresentaram produção semelhante, não havendo diferença significativa entre eles. Já em relação à produção de TNF- α no fígado, esta foi surpreendente, uma vez que foi superior nos grupos controle e estimulado apenas com IFN- γ do que nos grupos estimulados com LPS (Fig. 13A). O fato da experiência

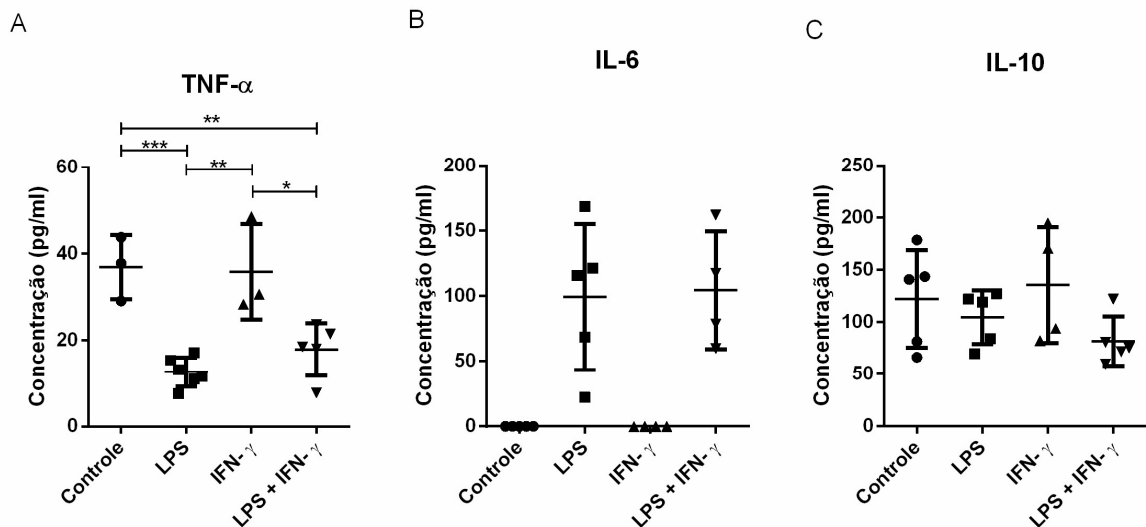
com fígado mostrar um perfil de produção de TNF- α oposto ao do coração, baço e sangue precisa ser confirmado em novos experimentos, quanto mais, porque não ocorreu para IL-6.

Figura 12 - Produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 pelo coração após dose alta de IFN- γ e desafio de LPS.



Animais C3H/HePas foram tratados com IFN- γ em uma única dose. Foi feito um desafio de LPS 24 h depois do tratamento com IFN- γ . Os animais passaram por perfusão, órgãos, coletados, pesados e parte deles, macerados em solução de inibidor de protease e PBS (P8340, Sigma) (Fig. 9A). O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (ELISA). A, B, e C. Dosagem de TNF- α , IL-6 e IL-10 no coração, respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado (n=5). *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001.

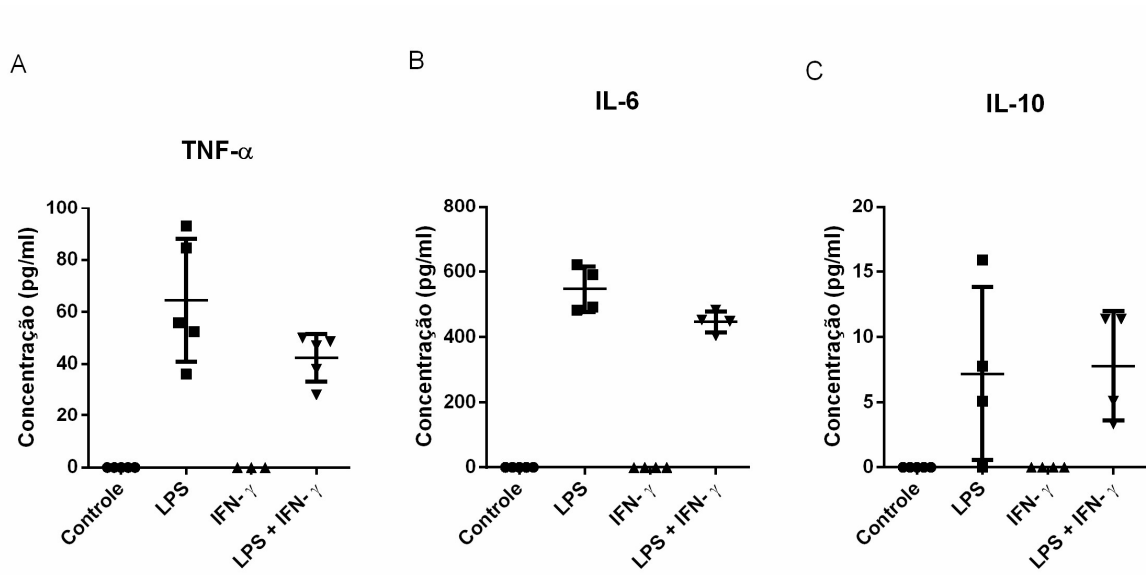
Figura 13 - Produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 pelo fígado após dose alta de IFN- γ e desafio de LPS.



Animais C3H/HePas foram tratados com IFN- γ em uma única dose. Foi feito um desafio de LPS 24 h depois do tratamento com IFN- γ . Os animais passaram por perfusão, órgãos, coletados, pesados e parte deles, macerados em solução de inibidor de protease e PBS (P8340, Sigma) (Fig. 9A). O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (ELISA). A, B, e C. Dosagem de TNF- α , IL-6 e IL-10 no fígado, respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado (n=5). *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001.

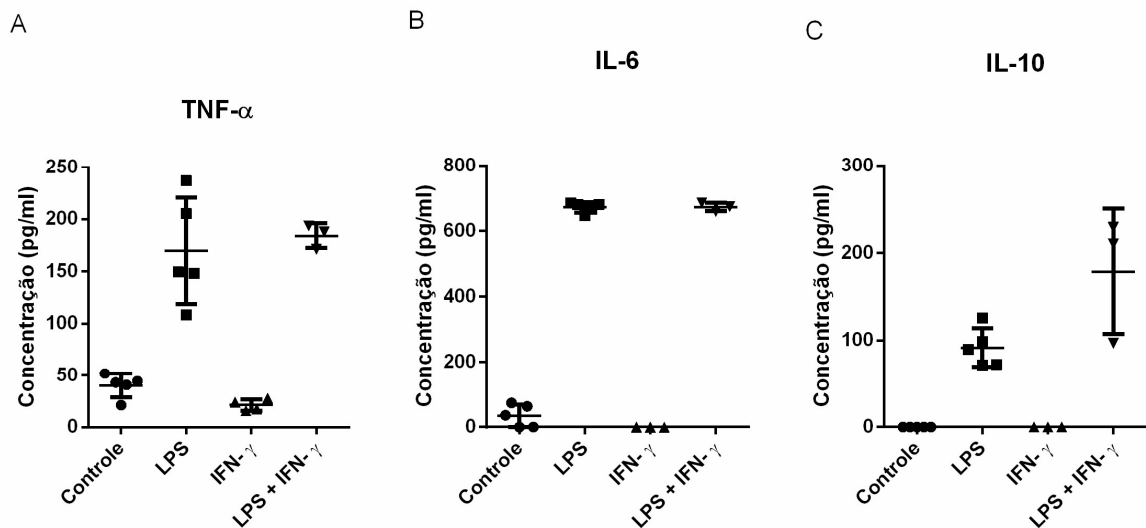
Em relação à produção de IL-6, TNF- α e IL-10 no baço e sangue, o perfil de produção das mesmas foi bem semelhante nos dois órgãos. As maiores quantidades destas citocinas foram encontradas sempre nos grupos desafiados com LPS, primados ou não com IFN- γ , não se observando diferenças significativas entre estes dois grupos (Figs. 14 e 15).

Figura 14 - Produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 pelo baço após dose alta de IFN- γ e desafio de LPS.



Animais C3H/HePas foram tratados com IFN- γ em uma única dose. Foi feito um desafio de LPS 24 h depois do tratamento com IFN- γ . Os animais passaram por perfusão, órgãos, coletados, pesados e parte deles, macerados em solução de inibidor de protease e PBS (P8340, Sigma) (Fig. 9A). O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (ELISA). A, B, e C. Dosagem de TNF- α , IL-6 e IL-10 no baço, respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado (n=5). *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001.

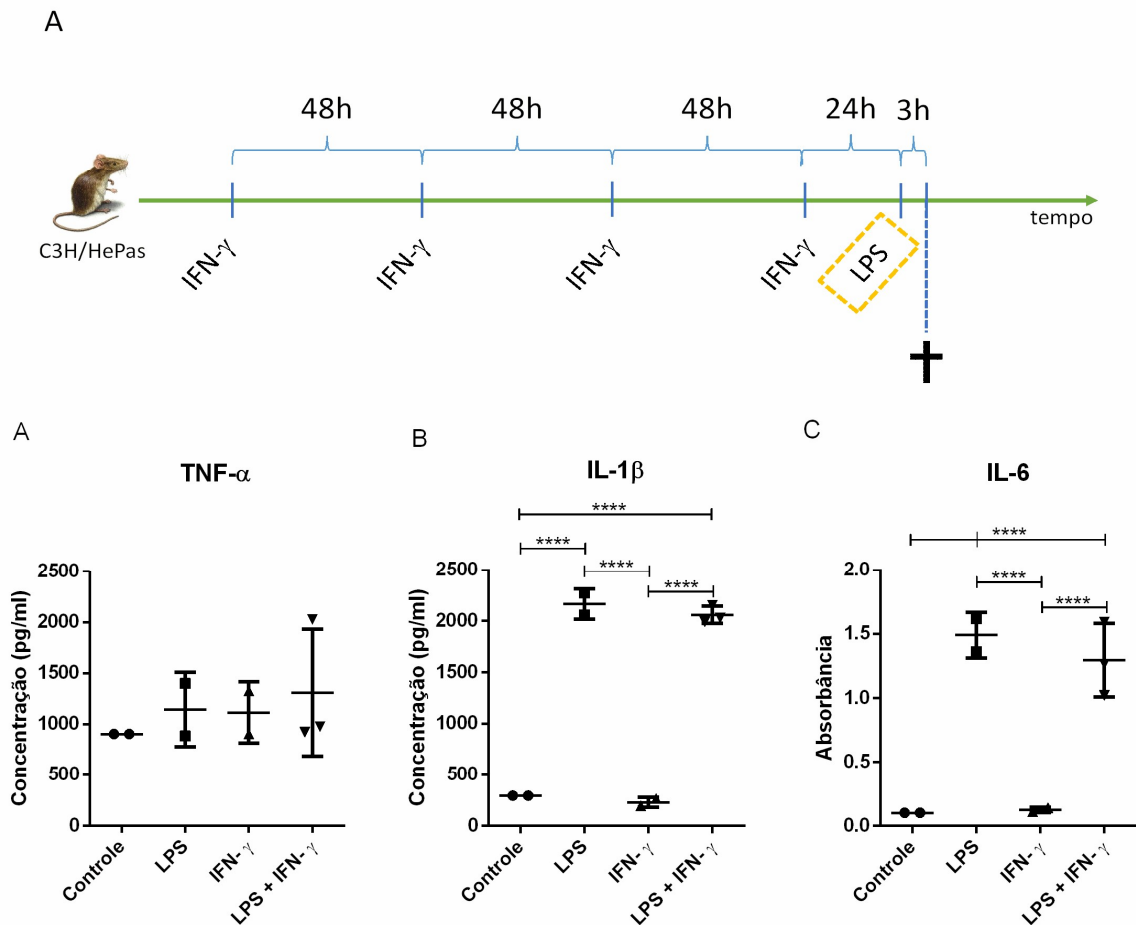
Figura 15 - Dosagem de TNF- α , IL-6 e IL-10 do sangue ne animais C3H/HePas tratados com dose alta de IFN- γ e desafiados com LPS.



Animais C3H/HePas foram tratados com IFN- γ em uma única dose. Foi feito um desafio de LPS 24h depois do tratamento com IFN- γ . O sangue foi coletado para a separação do soro. A, B, e C. Dosagem de TNF- α , IL-6 e IL-10 no soro do sangue, respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado (n=5). *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001.

Em um segundo conjunto de experimentos verificamos se há alteração na produção de citocinas em resposta ao LPS, em decorrência à estimulação continuada com baixa dose de IFN- γ , modelo que se aproxima ao de uma infecção crônica pelo *T. cruzi*. O *priming* com dose baixa de IFN- γ foi feito em 4 aplicações no prazo de 6 dias, com o intervalo de 48 h entre cada aplicação (i.v.; 15 ng/kg, 200 μ l). O desafio com LPS foi feito 24 h após a última aplicação de IFN- γ (i.p.; 4,5 mg/kg, 200 μ l). Após 3h do desafio de LPS, foi feita a perfusão com PBS de cada animal, coleta e pesagem do coração e fígado. Frações dos órgãos foram maceradas em PBS para coleta de sobrenadante e dosagem de citocinas (ELISA) (Fig. 16).

Figura 16 - Produção de citocinas pelo coração após *priming* sistêmico continuado por IFN- γ e desafio de LPS.



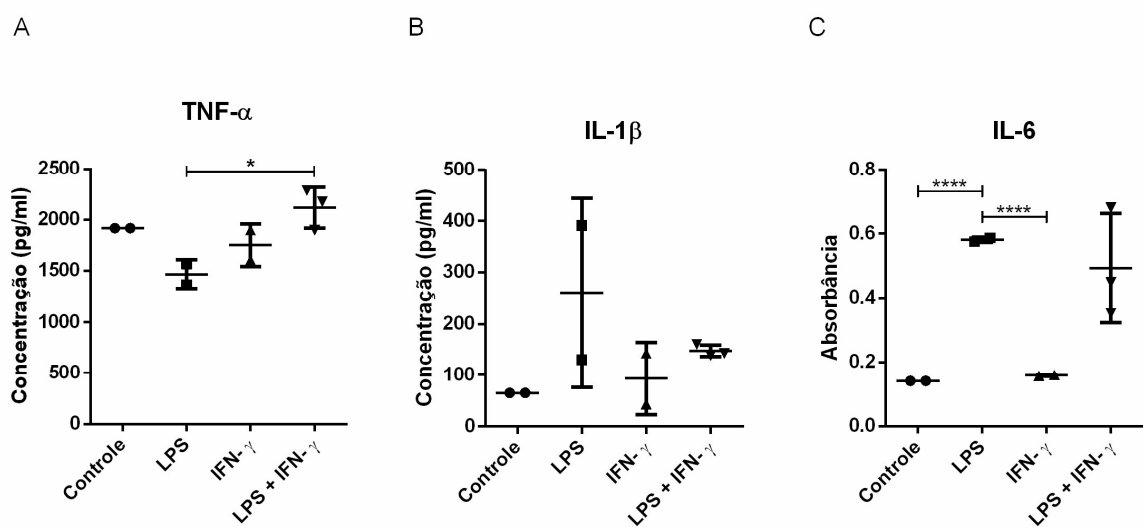
A. Esquema cronológico do experimento. Animais C3H/HePas foram primados com 4 doses de IFN- γ , com intervalo de 48 h entre cada aplicação. Às 24 h da última dose foi feito desafio com LPS. Depois de 3h da aplicação de LPS, os animais passaram por perfusão, órgãos, coletados, pesados e macerados. O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (ELISA). B. Dosagem de TNF- α . C. Dosagem de IL-1 β . D. Dosagem de IL-6. Dados representativos de um experimento realizado (n=3). *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001.

Nossos resultados preliminares demonstram que este *priming* com IFN- γ não resulta em mudanças significativas na produção de IL-1 β e IL-6 pelas células do coração estimuladas via sistêmica com LPS (em relação ao grupo tratado somente com LPS). Por outro lado, a produção de TNF- α se manteve em níveis basais, não se observando diferenças significativas na sua produção em resposta aos diferentes estímulos (Fig. 16).

Nestas experiências as dosagens de citocinas também foram realizadas no fígado (Fig. 17), visto que este órgão responde fortemente a alterações fisiológicas no organismo e poderia ser utilizado como controle positivo. No fígado, a produção de

TNF- α nos animais primados com IFN- γ e LPS foi superior à dos animais tratados exclusivamente com LPS. Já a produção de IL-6 foi superior no grupo tratado apenas com LPS, a resposta não se modificando pelo tratamento prévio com IFN- γ . Finalmente, a produção de IL-1 β não se mostrou diferente nos diferentes grupos experimentais.

Figura 17 - Produção de citocinas pelo fígado após *priming* sistêmico continuado por IFN- γ e desafio com LPS.

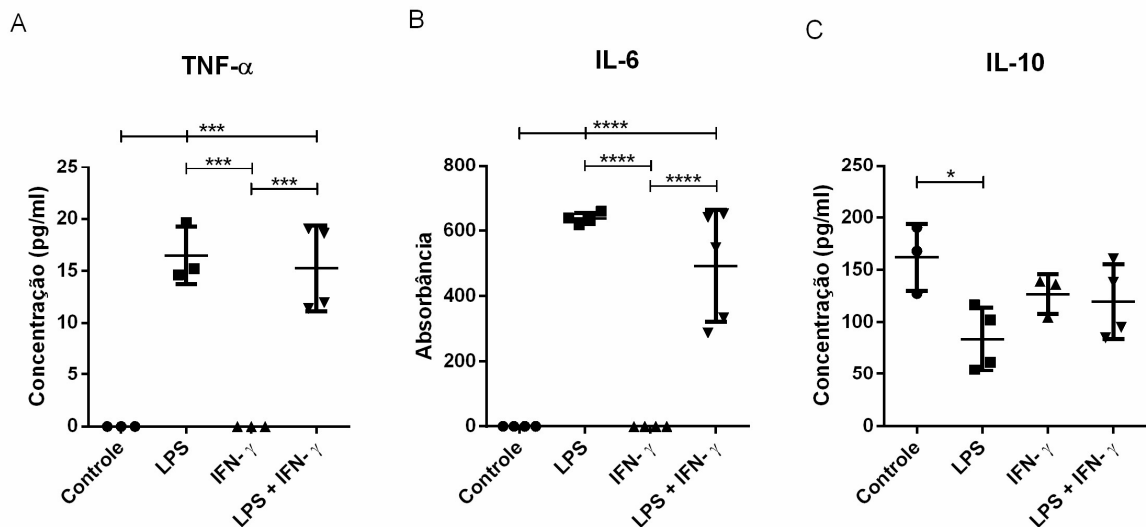


Animais C3H/HePas foram primados com 4 doses de IFN- γ , com intervalo de 48 h entre cada aplicação. Às 24 h da última dose foi feito desafio com LPS. Depois de 3h da aplicação de LPS, os animais passaram por perfusão, órgãos, coletados, pesados e macerados. O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (ELISA) (Fig. 16A). A. Dosagem de TNF- α . B. Dosagem de IL-1 β . C. Dosagem de IL-6. Dados representativos de um experimento realizado (n=3). *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001.

Em todas as análises, a produção de citocinas pelo grupo estimulado somente com IFN- γ foi semelhante ao grupo controle, evidenciando que, ao menos na dose utilizada, o tratamento não causa nenhuma alteração por si.

Em uma repetição do mesmo experimento, além do coração e fígado, foi também abordada a análise da produção de citocinas no baço e soro dos animais, bem como analisada a produção de IL-10. A produção de IL-1 β foi deixada para outro momento.

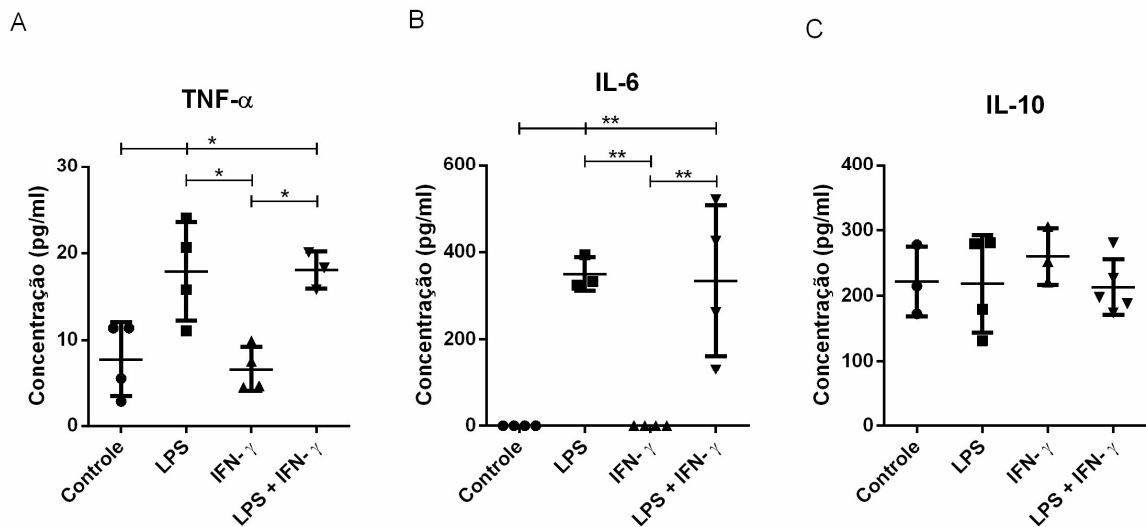
Figura 18 - Produção de citocinas pelo coração após *priming* sistêmico continuado por IFN- γ e desafio com LPS.



Animais C3H/HePas foram primados com 4 doses de IFN- γ , com intervalo de 48 h entre cada aplicação. Às 24 h da última dose foi feito desafio com LPS. Depois de 3h da aplicação de LPS, os animais passaram por perfusão após sangria, órgãos, coletados, pesados e macerados em solução de inibidor de protease e PBS (P8340, Sigma). O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (ELISA) (Fig. 16A). A. Dosagem de TNF- α . B. Dosagem de IL-6. C. Dosagem de IL-10. Dados representativos de um experimento realizado. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

A produção de IL-6 seguiu o padrão observado no experimento anterior, tanto no coração (Fig. 18) quanto no fígado (Fig. 19), baço (Fig. 20) e soro (Fig. 21), evidenciando a reprodutibilidade do experimento. Diferentemente, neste experimento a produção de TNF- α mostrou um perfil pró-inflamatório no coração, fígado e baço, similar ao de IL-6, o que em certa forma era esperado. Dessa forma, a produção foi maior nos grupos estimulados com LPS que a dos grupos controle. Contudo, em forma análoga ao experimento anterior, o tratamento prévio com IFN- γ não gerou alterações significativas.

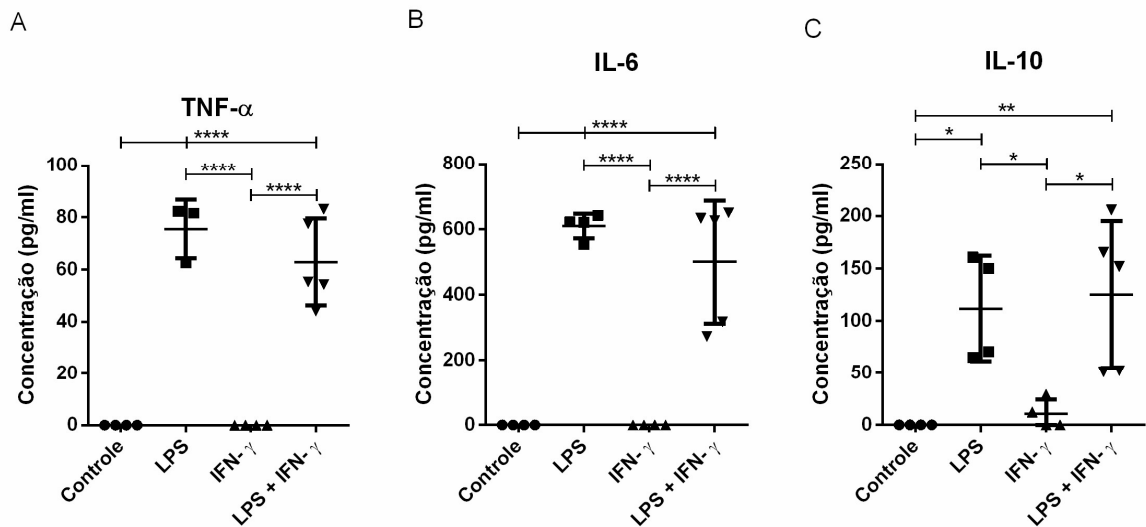
Figura 19 - Produção de citocinas pelo fígado após *priming* sistêmico continuado por IFN- γ e desafio com LPS.



Animais C3H/HePas foram primados com 4 doses de IFN- γ , com 4 doses de IFN- γ , com intervalo de 48 h entre cada aplicação. Às 24 h da última dose foi feito desafio com LPS. Depois de 3h da aplicação de LPS, os animais passaram por perfusão após sangria, órgãos, coletados, pesados e macerados em solução de inibidor de protease e PBS (P8340, Sigma). O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (ELISA) (Fig. 16A). A. Dosagem de TNF- α . B. Dosagem de IL-6. C. Dosagem de IL-10. Dados representativos de um experimento realizado. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

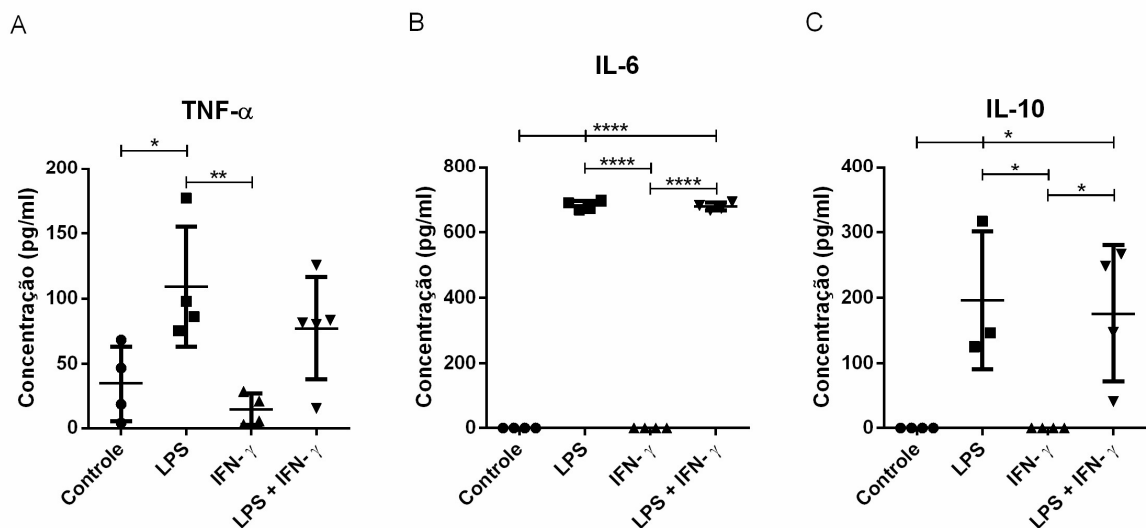
Em relação a produção de IL-10 no coração, foi observado de que sua maior concentração ocorre em condições sem desafio com LPS e sem tratamento com IFN- γ . Isso sugere de que o microambiente do coração já é pré-disposto a ser mais regulador. Em relação aos outros órgãos, baço e soro apresentaram uma concentração de IL-10 sob mesmo perfil, sendo maior nos grupos desafiados com LPS do que nos controles, e sem diferença significativa em relação aos tratados com IFN- γ . Já no fígado, essa produção se manteve similar entre os grupos.

Figura 20 - Produção de citocinas pelo baço após *priming* sistêmico continuado por IFN- γ e desafio com LPS.



Animais C3H/HePas foram primados com 4 doses de IFN- γ , com intervalo de 48 h entre cada aplicação. Às 24 h da última dose foi feito desafio com LPS. Depois de 3 h da aplicação de LPS, os animais passaram por perfusão após sangria, órgãos, coletados, pesados e macerados em solução de inibidor de protease e PBS (P8340, Sigma). O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (ELISA) (Fig. 16A). A. Dosagem de TNF- α . B. Dosagem de IL-6. C. Dosagem de IL-10. Dados representativos de um experimento realizado. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Figura 21 - Concentração de citocinas encontradas no soro após *priming* sistêmico continuado por IFN- γ e desafio com LPS.



Animais C3H/HePas foram primados com 4 doses de IFN- γ , com intervalo de 48 h entre cada aplicação. Às 24 h da última dose foi feito desafio com LPS. Depois de 3 h da aplicação de LPS, os animais passaram por perfusão após sangria, órgãos, coletados, pesados e macerados em solução de inibidor de protease e PBS (P8340, Sigma). O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de

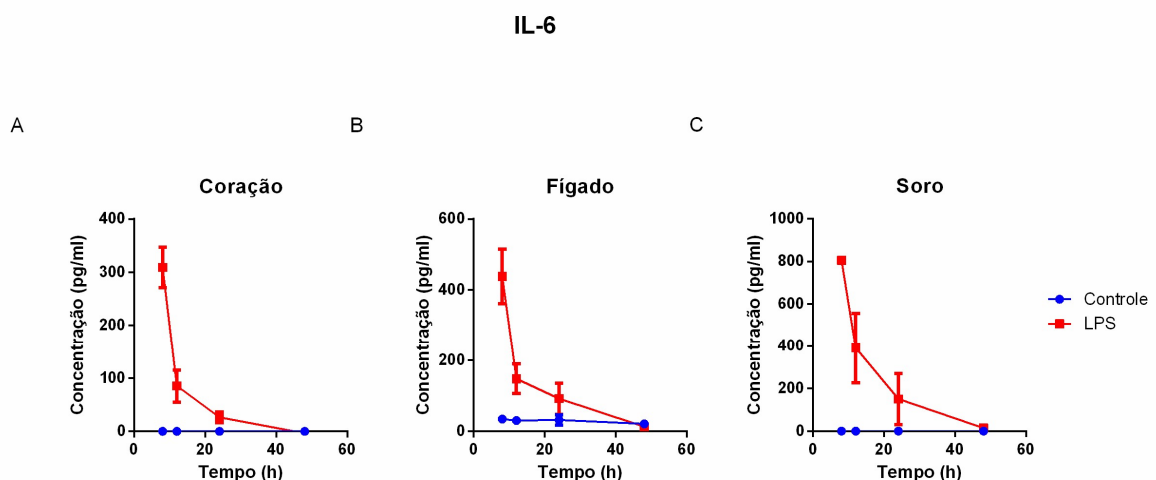
citocinas (ELISA) (Fig. 16A). A. Dosagem de TNF- α . B. Dosagem de IL-6. C. Dosagem de IL-10. Dados representativos de um experimento realizado. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Nos experimentos *in vivo* mostrados acima esperávamos uma produção diferente de citocinas (aumentada ou diminuída) nos animais que passaram por *priming* sistêmico continuado com IFN- γ e desafio por LPS. Entretanto, essa produção diferenciada não foi observada, resultado que poderia sugerir insuficiência das doses de IFN- γ utilizadas no *priming*, ou baixa atividade do preparado de IFN- γ inicialmente utilizado.

Contudo, no exame de qualificação a banca examinadora considerou a necessidade de uma curva de resposta de citocinas *in vivo* com os animais em questão, visto que o pico de produção de algumas destas citocinas poderia estar ocorrendo um período mais tardio do que nas 3 h após a incubação com LPS.

Para verificar esta possibilidade, animais C3H/HePas foram tratados com LPS (i.p.; 4,5 mg/kg, 200 μ l) ou PBS, e, em diferentes momentos após o tratamento, foram coletadas amostras de sangue, o que foi seguido de perfusão antes da coleta do coração e fígado. Assim como em todos os outros experimentos *in vivo*, o soro foi separado das amostras de sangue e os órgãos foram macerados, agora em solução RIPA com um coquetel de inibidores de protease. Desse homogenato, o sobrenadante foi usado para as dosagens (ELISA).

Figura 22 - Curva de dosagem de IL-6 do coração, fígado e soro de animais C3H/HePas desafiados com LPS.



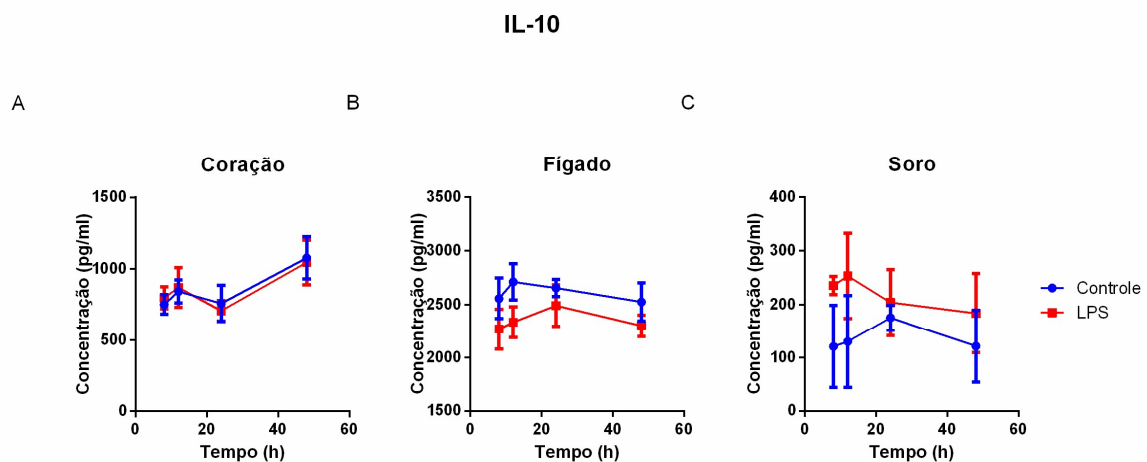
Animais C3H/HePas foram desafiados com LPS. Os animais foram eutanaseados e as amostras coletadas nos tempos de 8, 12, 24 ou 48 h após desafio por LPS. Órgãos macerados em solução de RIPA com coquetel de inibidores de protease. Soro foi separado do sangue. Citocinas foram dosadas

por ELISA de acordo com o protocolo do fabricante. A, B, e C. Dosagem de IL-6 no coração, fígado e soro, respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado (n=4). *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001.

A escolha de tempos de coleta mais tardios (8, 12, 24 e 48 h) que o anteriormente utilizado (3 h) veio da observação dos próprios experimentos *in vitro* em que células estruturais, principalmente cardiomiócitos, produzem citocinas, tal como a IL-6, a partir de 24 h. Além disso, nossos resultados de experimentos anteriores e a própria literatura relacionada a sepse afirmam que a produção de citocinas não ocorre em períodos tão precoces, quiçá havendo diferenças entre elas.

A pesar que a produção de TNF- α não foi observada nas amostras de 8 - 48 h, os nossos resultados mostram ainda uma produção elevada de IL-6 que tem seu pico às 8 h após a administração do LPS, dado que é recorrente no coração, fígado e no soro. Além disso, essa produção diminui bruscamente com o passar das h (Fig. 22).

Figura 23 - Curva de dosagem de IL-10 do coração, fígado e soro de animais C3H/HePas desafiados com LPS.



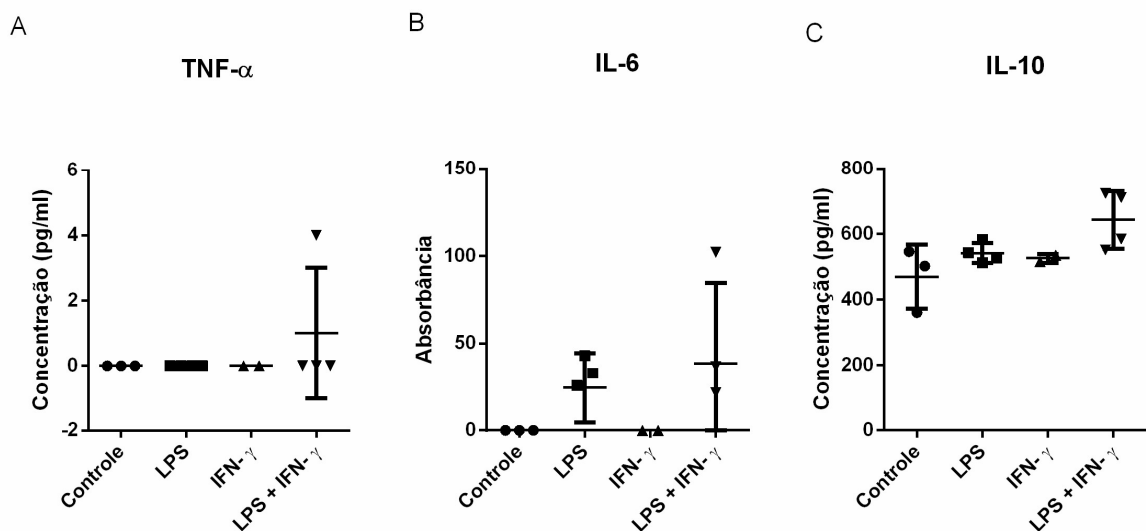
Animais C3H/HePas foram desafiados com LPS. Os animais foram eutanaseados e as amostras coletadas nos tempos de 8, 12, 24 ou 48 h após desafio por LPS. Órgãos macerados em solução de RIPA com coquetel de inibidores de protease. Soro foi separado do sangue. Citocinas foram dosadas por ELISA de acordo com o protocolo do fabricante. A, B, e C. Dosagem de IL-10 no coração, fígado e soro, respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado (n=4). *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001.

Quanto a produção de IL-10 (Fig. 23), nota-se uma diferença no fígado, uma vez que o grupo estimulado com LPS apresenta uma quantidade inferior de IL-10 frente ao grupo tratado tão somente com PBS. Ainda, não observamos diferenças na

produção de IL10 no coração, e, no soro, onde os grandes desvios encontrados tornam os resultados inconclusivos.

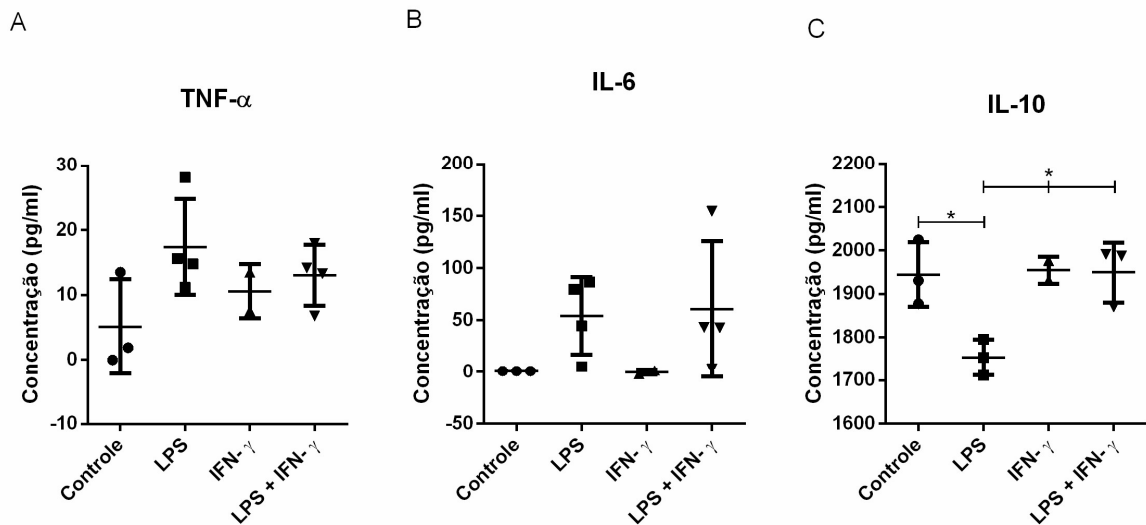
Em face a estes resultados e considerando que altos níveis de IL-6 foram produzidos as 8 h do desafio por LPS, decidimos repetir os experimentos de *priming* com IFN- γ por 6 dias, agora com a eutanásia dos animais e a coleta das amostras biológicas com 8 h após a aplicação do LPS.

Figura 24 - Produção de citocinas pelo coração após *priming* sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.



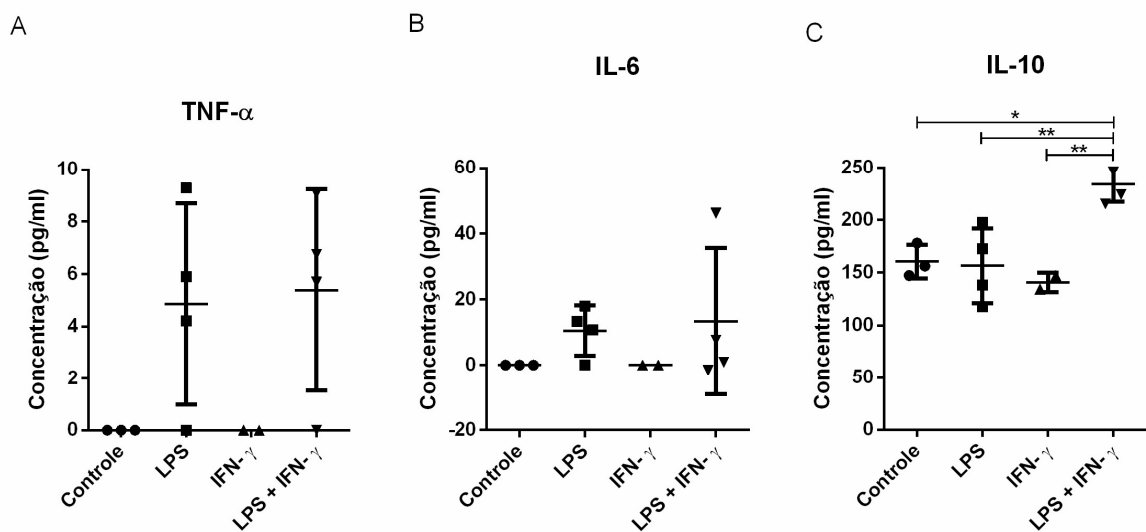
Animais C3H/HePas foram primados com 4 doses de IFN- γ , com intervalo de 48 h entre cada aplicação. Às 24 h da última dose foi feito desafio com LPS. Depois de 8 h da aplicação de LPS, os animais passaram por perfusão após sangria, órgãos, coletados, pesados e macerados em solução de inibidor de protease e RIPA. O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (ELISA). A. Dosagem de TNF- α . B. Dosagem de IL-6. C. Dosagem de IL-10. Dados representativos de três experimentos realizados. Barra demonstra diferença significativa sempre do grupo a extrema esquerda em relação aos grupos a sua direita, sendo * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Figura 25 - Produção de citocinas pelo fígado após *priming* sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.



Animais C3H/HePas foram primados com 4 doses de IFN- γ , com intervalo de 48 h entre cada aplicação. Às 24 h da última dose foi feito desafio com LPS. Depois de 8 h da aplicação de LPS, os animais passaram por perfusão após sangria, órgãos, coletados, pesados e macerados em solução de inibidor de protease e RIPA. O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (ELISA). A. Dosagem de TNF- α . B. Dosagem de IL-6. C. Dosagem de IL-10. Dados representativos de três experimentos realizados. Barra demonstra diferença significativa sempre do grupo a extrema esquerda em relação aos grupos a sua direita, sendo * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

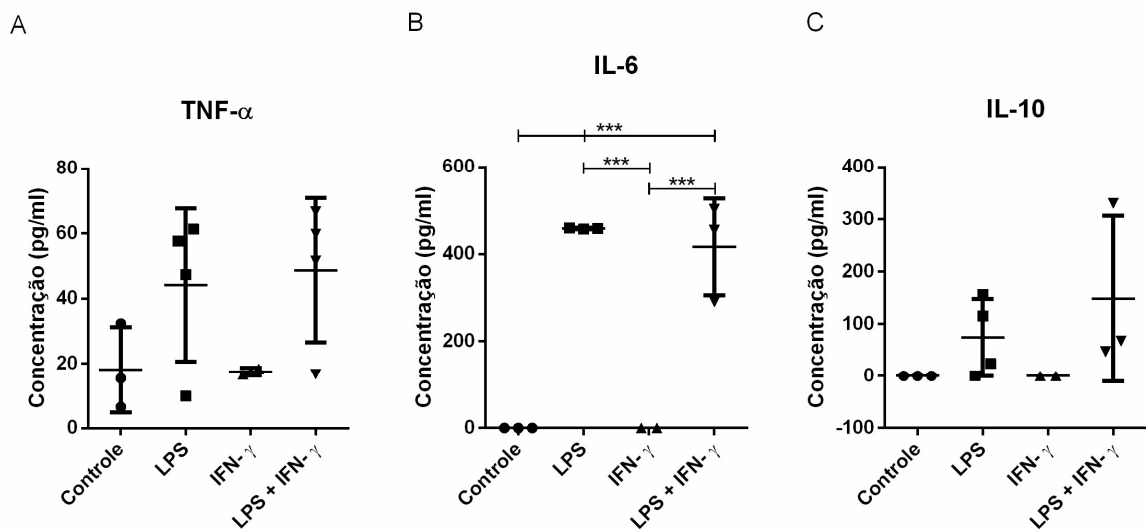
Figura 26 - Produção de citocinas pelo baço após *priming* sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.



Animais C3H/HePas foram primados com 4 doses de IFN- γ , com intervalo de 48 h entre cada aplicação. Às 24 h da última dose foi feito desafio com LPS. Depois de 8 h da aplicação de LPS, os animais passaram por perfusão após sangria, órgãos, coletados, pesados e macerados em solução de inibidor de protease e RIPA. O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (ELISA).

A. Dosagem de TNF- α . B. Dosagem de IL-6. C. Dosagem de IL-10. Dados representativos de três experimentos realizados. Barra demonstra diferença significativa sempre do grupo a extrema esquerda em relação aos grupos a sua direita, sendo * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Figura 27 - Dosagem de citocinas presentes no soro após *priming* sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.



Animais C3H/HePas foram primados com 4 doses de IFN- γ , com intervalo de 48 h entre cada aplicação. Às 24 h da última dose foi feito desafio com LPS. Depois de 8 h da aplicação de LPS, os animais passaram por perfusão após sangria, órgãos, coletados, pesados e macerados em solução de inibidor de protease e RIPA. O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (ELISA). A. Dosagem de TNF- α . B. Dosagem de IL-6. C. Dosagem de IL-10. Dados representativos de três experimentos realizados. Barra demonstra diferença significativa sempre do grupo a extrema esquerda em relação aos grupos a sua direita, sendo * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

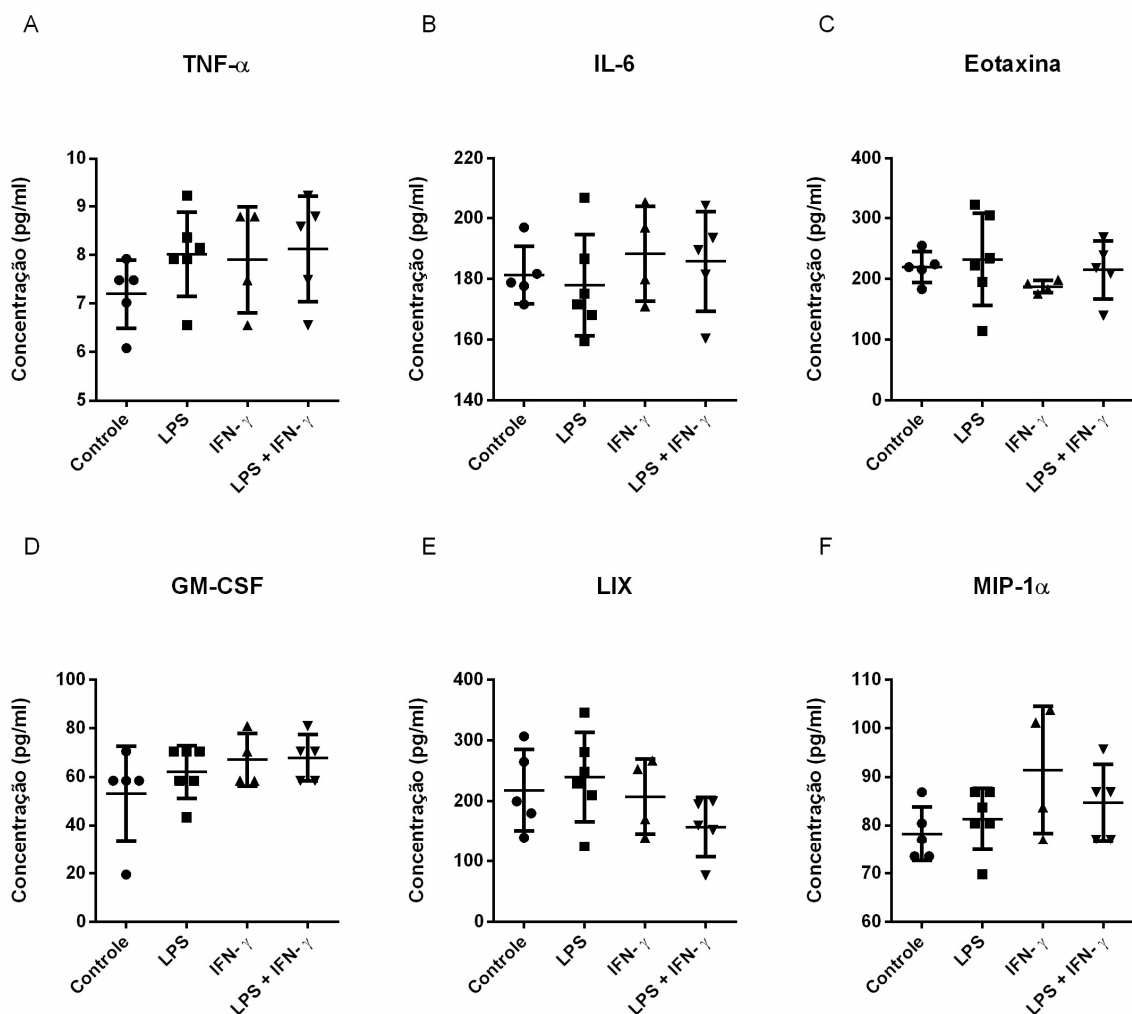
Nossos experimentos demonstraram que quase todos os órgãos apresentaram produção de citocinas semelhantes entre os grupos controles (grupo PBS e grupo IFN- γ), vezes onde os tratamentos foram insuficientes em desencadear algum tipo de produção diferente que o grupo tratado tão somente com PBS, vezes pelo estímulo de IFN- γ não ser eficaz por causar *priming* e alterar a produção de citocinas nos órgãos. Em exceção a esses casos, apenas o baço e fígado em um dos nossos experimentos apresentou diferença significativa em relação à produção de IL-10 (Figs. 25C e Fig. 26C, respectivamente).

A produção de citocinas observadas nesse nosso modelo experimental (estímulo de LPS por 8 h) não consegue responder se o *priming* continuado com baixas doses de IFN- γ é eficiente na indução de um quadro mais antiinflamatório para a resolução de quadros de infecção por *T. cruzi*, simulados, no caso, com a administração de LPS. Nesse sentido, amostras dos mesmos experimentos utilizadas

para a dosagem de citocinas por ELISA fora usadas para a realização de um Multiplex. Assim, mais análises podem ser envolvidas para a obtenção de um perfil mais esclarecedor. Foram utilizadas amostras do fígado, já que é um órgão de metabolismo sensível a várias alterações sistêmicas, e do coração, uma vez que é o principal órgão alvo de nosso estudo.

Para o perfil de citocinas e quimiocinas envolvidas na análise por Multiplex, usamos um padrão de citocinas envolvidas com a resposta imune inata: Eotaxina, RANTES, TNF- α , VEGF, GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IP-10, KC, LIF, LIX, MCP-1, M-CSF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2 e G-CSF.

Figura 28 - Produção de TNF- α , IL-6, Eotaxina, GM-CSF, LIX e MIP-1 α no fígado após *priming* sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.

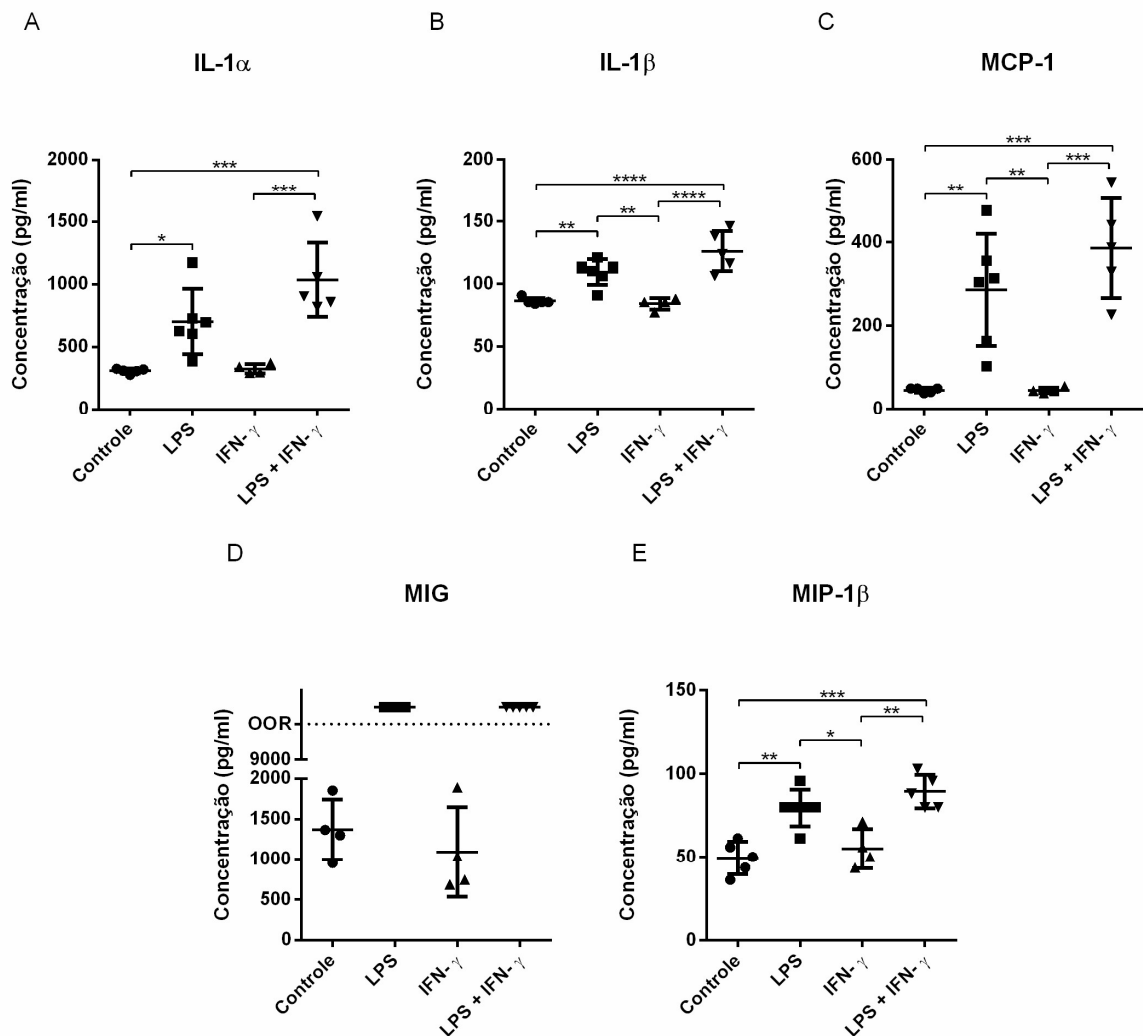


Animais C3H/HePas foram primados com 4 doses de IFN- γ , com intervalo de 48 h entre cada aplicação. Às 24 h da última dose foi feito desafio com LPS. Depois de 8 h da aplicação de LPS, os animais passaram por perfusão após sangria, órgãos, coletados, pesados e macerados em solução de inibidor

de protease e RIPA. O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (Milliplex). *A, B, C, D, E* e *F*. Dosagem de TNF- α , IL-6, Eotaxina, GM-CSF, LIX e MIP-1 α , respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado. Barra demonstra diferença significativa sempre do grupo a extrema esquerda em relação aos grupos a sua direita, sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Em relação ao fígado, os tratamentos aos animais de PBS, LPS e/ou IFN- γ não foram eficientes como estímulos para a produção de TNF- α , IL-6, eotaxina, GM-CSF, LIX e MIP-1 α (Figs. 28A a 28F). É interessante ressaltar que, assim como nas análises de todos os nossos experimentos *in vivo*, a produção de TNF- α reproduziu, nesses momentos e nessas doses de estímulos, uma baixíssima produção de citocinas, tal qual observado nas dosagens por ELISA.

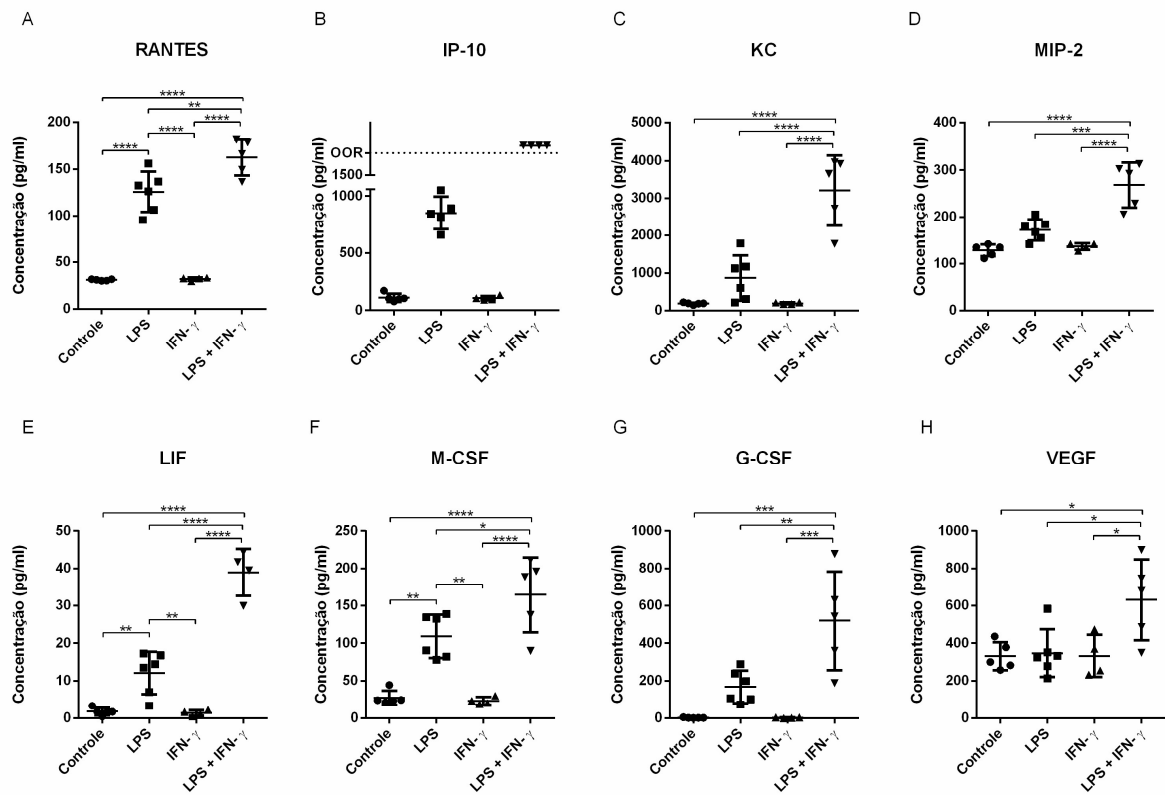
Figura 29 - Produção de IL-1 α , IL-1 β , MCP-1, MIG e MIP1- β no fígado após *priming* sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.



Animais C3H/HePas foram primados com 4 doses de IFN- γ , com intervalo de 48 h entre cada aplicação. Às 24 h da última dose foi feito desafio com LPS. Depois de 8 h da aplicação de LPS, os animais passaram por perfusão após sangria, órgãos, coletados, pesados e macerados em solução de inibidor de protease e RIPA. O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (Milliplex). A, B, C, D e E. Dosagem de IL-1 α , IL-1 β , MCP-1, MIG e MIP1- β , respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado. Barra demonstra diferença significativa sempre do grupo a extrema esquerda em relação aos grupos a sua direita, sendo * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Em contrapartida, o desafio de LPS nessa dosagem foi capaz de induzir uma produção de citocinas com relevância significativa em relação aos grupos controles, mas sem indicio de eficiência do tratamento de *priming* com IFN- γ para as citocinas IL-1 α , IL-1 β , MCP-1 e MIP1- β (Figs. 28A, 28B, 28C a 28E).

Figura 30 - Produção de RANTES, IP-10, KC, MIP-2, LIF, M-CSF, G-CSF e VEGF no fígado após *priming* sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.



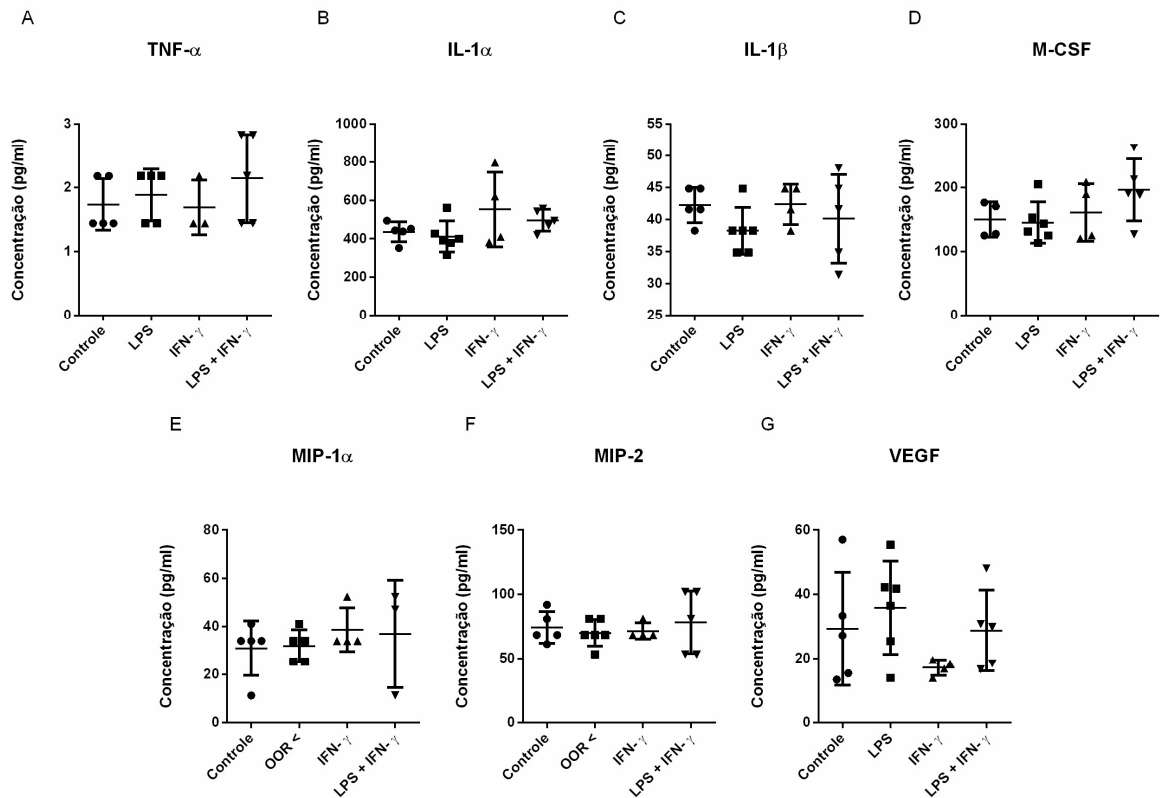
Animais C3H/HePas foram primados com 4 doses de IFN- γ , com intervalo de 48 h entre cada aplicação. Às 24 h da última dose foi feito desafio com LPS. Depois de 8 h da aplicação de LPS, os animais passaram por perfusão após sangria, órgãos, coletados, pesados e macerados em solução de inibidor de protease e RIPA. O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (Milliplex). A, B, C, D, E, F, G e H. Dosagem de IP-10, KC, MIP-2, LIF, M-CSF, G-CSF e VEGF, respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado. Barra demonstra diferença significativa sempre do grupo a extrema esquerda em relação aos grupos a sua direita, sendo * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Considerando o efeito de *priming* por IFN- γ , as citocinas RANTES, KC, MIP-2, LIF, M-CSF, G-CSF e VEGF apresentaram produção acima quando comparadas com os grupos controle (Figs. 29A, 29C a 29H).

Existem, no entanto, particularidades a serem evidenciadas. A dosagem de MIG no fígado quando tratado com LPS, independente de IFN- γ , é superior a sensibilidade do ensaio (Fig. 28D). Isso fez com que fosse impossível de determinar nessa dosagem se o IFN- γ consegue expressar *priming*, fosse de “*up-regulation*” ou “*down-regulation*” no nosso experimento. Semelhante a esse caso, a produção de IP-10 pelo fígado quando primado com IFN- γ e desafiado com LPS extrapolou a sensibilidade do teste (Fig, 29B). Isso faz com que a estatística não seja de fato

determinada, mas claramente é um grupo onde o *priming* por IFN- γ aumenta a produção desta citocina.

Figura 31 - Produção de TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , M-CSF, MIP-1 α , MIP-2 e VEGF no coração após *priming* sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.

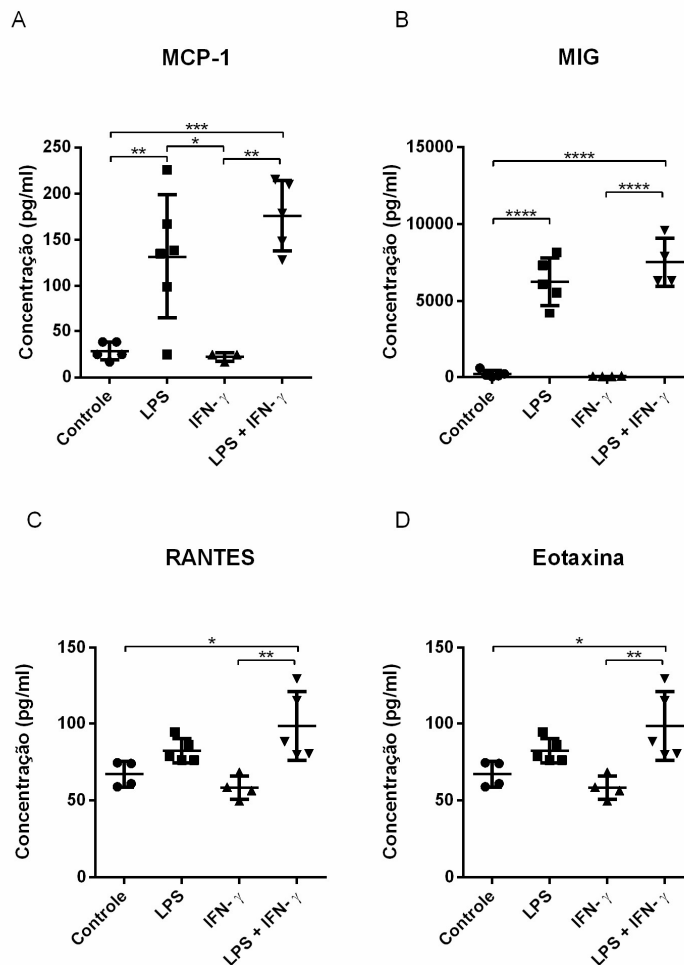


Animais C3H/HePas foram primados com 4 doses de IFN- γ , com intervalo de 48 h entre cada aplicação. Às 24 h da última dose foi feito desafio com LPS. Depois de 8 h da aplicação de LPS, os animais passaram por perfusão após sangria, órgãos, coletados, pesados e macerados em solução de inibidor de protease e RIPA. O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (Milliplex). A, B, C, D, E, F e G. Dosagem de TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , M-CSF, MIP-1 α , MIP-2 e VEGF, respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado. Barra demonstra diferença significativa sempre do grupo a extrema esquerda em relação aos grupos a sua direita, sendo * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Já em relação ao coração, o estímulo de PBS, IFN- γ e/ou LPS nessas dosagens foi insuficiente para induzir a produção de qualquer quantidade detectável pelo teste de GM-CSF, LIX e MIP1- β (dados não mostrados).

Os tratamentos realizados aos animais também não surtiram efeito de diferenciação para a produção de TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , M-CSF, MIP-1 α , MIP-2 e VEGF em relação aos grupos controles (Fig.30A a 30G)

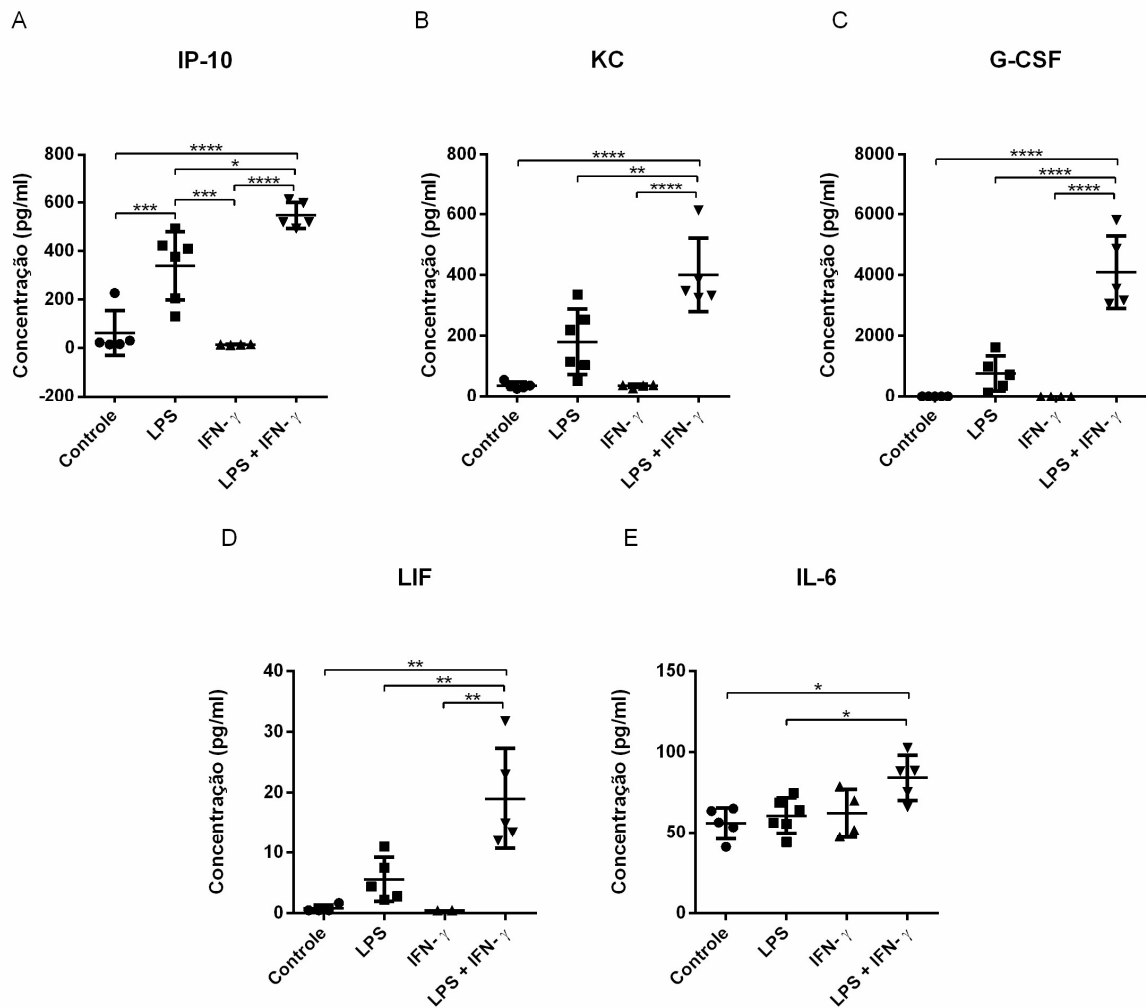
Figura 32 - Produção de MCP-1, MIG, RANTES e eotaxina no coração após *priming* sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.



Animais C3H/HePas foram primados com 4 doses de IFN- γ , com intervalo de 48 h entre cada aplicação. Às 24 h da última dose foi feito desafio com LPS. Depois de 8 h da aplicação de LPS, os animais passaram por perfusão após sangria, órgãos, coletados, pesados e macerados em solução de inibidor de protease e RIPA. O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (Milliplex). *A, B, C e D*. Dosagem de MCP-1, MIG, RANTES e eotaxina, respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado. Barra demonstra diferença significativa sempre do grupo a extrema esquerda em relação aos grupos a sua direita, sendo * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Em relação aos grupos que mostraram produção de citocinas não basal, o efeito de *priming* não foi observado para MCP-1, MIG, RANTES e eotaxina (Fig. 31A a 31D).

Figura 33 - Produção de IP-10, KC, G-CSF, LIF e IL-6 no coração após *priming* sistêmico de IFN- γ e desafio de LPS.



Animais C3H/HePas foram primados com 4 doses de IFN- γ , com intervalo de 48 h entre cada aplicação. Às 24 h da última dose foi feito desafio com LPS. Depois de 8 h da aplicação de LPS, os animais passaram por perfusão após sangria, órgãos, coletados, pesados e macerados em solução de inibidor de protease e RIPA. O sobrenadante desse macerado foi coletado para dosagem de citocinas (Milliplex). A, B, C, D e E.. Dosagem de IP-10, KC, G-CSF, LIF e IL-6, respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado. Barra demonstra diferença significativa sempre do grupo a extrema esquerda em relação aos grupos a sua direita, sendo * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Diferentemente, houve produção diferenciada graças ao *priming* por IFN- γ para as citocinas IP-10, KC, G-CSF, LIF e IL-6 (Fig. 32A a 32E).

Agonistas de *Toll Like Receptor 4* (TLR4) estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-8, IL-6 e TNF- α (Gu et al., 2015). Células do coração, tais como cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos, são capazes de produzir essas e outras citocinas quando estimuladas com LPS (Aoyagi, Matsui, 2012; Boyd et al., 2006; Brown, Jones, 2004; Sandanger et al., 2013). No entanto, a produção de citocinas por parte de cada uma dessas populações celulares pode ser diferente quanto ao mesmo estímulo. Por exemplo, a estimulação por LPS de fibroblastos cardíacos, mas não de cardiomiócitos, é capaz de induzir a ativação de Caspase-1, via inflamassoma, com liberação de IL-1 β (Kawaguchi et al., 2011). No entanto, quando estimulados com ATP ou nigericina, os cardiomiócitos são capazes de ativar caspase-1 e desencadear o quadro de piroptose sem induzir a liberação de IL-1 β (Marchetti et al., 2015; Mezzaroma et al., 2011; Takahashi, 2014). Em nossos experimentos, tanto os cardiomiócitos HL-1 como o coração de camundongos C3H/HePas foram incapazes de produzir IL-1 β em resposta ao LPS.

Estímulos ao TLRs por PAMPS e/ou DAMPS desencadeiam inflamação aguda do miocárdio (Mann, 2011). É sabido que o coração, em quadros de inflamação, apresenta infiltrado inflamatório de células do sistema imunológico propriamente dito, tais como linfócitos T e células *Natural Killer* (NK), que produzem IFN- γ em grandes quantidades (Han et al., 2012; Rangachari et al., 2006). Quadros de inflamação persistente levam à produção constante de altas quantidades de IFN- γ e o agravamento de miocardites (Cheng et al., 2005). O IFN- γ ativa células do eixo monócito-macrófago circulantes e residentes e potencializa a expressão gênica de citocinas após o reconhecimento de patógenos, evento conhecido como *priming* (Chow et al., 2014; Lorsbach et al., 1993; Ma et al., 1996; Murray, 1988; Sanceau et al., 1991). Ainda, estudos de estimulação de cardiomiócitos HL-1 com IFN- γ demonstram que o *priming* induz a ativação e sinalização de AIM-2 por uma via independente de inflamassoma e que desencadeia um papel anti-inflamatório via inibição de fosforilação de STAT1 (Furrer et al., 2016).

Muito se sabe sobre o potencial das células do infiltrado inflamatório na resolução de uma infecção e reparo tecidual, bem como de seus receptores e funções relacionadas. Entretanto, a estimulação que células estruturais necessitam receber para que passem a produzir citocinas de uma reposta dita inata é muito maior se comparada com a de células pertencentes ao sistema imune, uma vez que no estado

basal cardiomiócitos não expressam citocinas inflamatórias de forma constitutiva (Kapadia et al., 1995; Kapadia et al., 1997).

Células estruturais também participam de todas as fases da resposta imunológica (Lin, Knowlton, 2014). Portanto, desenhamos nossos experimentos para determinar a participação dos cardiomiócitos frente à estimulação com IFN- γ em esquemas de tratamento que se aproximam a casos agudos e crônicos de inflamação, procurando saber se esse tratamento tem ação de *priming* sobre as células cardíacas *in vitro* e *in vivo*. No presente trabalho, determinamos que o IFN- γ modula positivamente a produção de diversas citocinas, tanto *in vivo* no coração (IP-10, KC, G-CSF, LIF e IL-6), como *in vitro* por células HL-1 (IP-10, MCP-1, G-CSF, RANTES, MIG, IL-6, MIF). Além disso, *in vitro*, o IFN- γ foi capaz de diminuir a produção de VEGF e GM-CSF nos cardiomiócitos HL-1 em relação aos grupos tratados apenas com LPS.

O espectro de citocinas expressas por cardiomiócitos em nossos modelos demonstra fortemente que estas células são capazes de se sensibilizar e responder frente à PAMPs e DAMPs de forma variada (Aoyagi, Matsui, 2012; Boyd et al., 2006; Brown, Jones, 2004; Sandanger et al., 2013). Além disso, a constatação das diferenças nessas produções quando as células são tratadas por IFN- γ corrobora a hipótese de que, em eventuais infecções, as células estruturais têm papel ativo no curso da resposta inflamatória (Lin, Knowlton, 2014).

Um fato importante a ser ressaltado é a produção de TNF- α no sobrenadante de cardiomiócitos HL-1 e macerado do coração de camundongos C3H/HePas. Embora o TNF- α seja uma das citocinas mais estudadas em relação a doenças do coração, como infarto do miocárdio e miocardite autoimune (Valaperti, 2016), não observamos níveis detectáveis em muitos dos nossos experimentos. Além disso, a produção de IL-6 também se mostrou aquém do esperado nos quadros de inflamação já descritos (Guillen et al., 1995).

Outro fator interessante é a produção de VEGF e GM-CSF, que tiveram “*down*”-reguladas a sua produção *in vitro* por células HL-1, quando estas células passaram por *priming* de 24h de IFN- γ . Ambas são citocinas que estão relacionadas com o curso natural da resposta inflamatória, causando maior vascularização e recrutando granulócitos da corrente sanguínea para o microambiente em questão, promovendo maior infiltrado inflamatório, e descritas como estimuladas pela ativação por LPS de TLR-4 (Akagawa et al., 2006; Sun et al., 2016; Veikkola et al., 2000).

Juntos, todos esses fatores se agrupam pela característica de desafiarem as funções clássicas de pró-inflamação. Ainda, em estudos sobre obesidade foi demonstrado que a produção de IL-6 pode induzir os macrófagos a aumentar a expressão de receptores de IL-4 e a responder a esta citocina antiinflamatória e, desta forma, aumentar o número de macrófagos reguladores com um perfil alternativo (tipo M2) (Mauer et al., 2014).

O perfil de citocinas pró-inflamatórias ausentes (TNF- α), com produção baixa (IL-6) ou ainda “*down*”-reguladas (VEGF e GM-CSF), sugere que o tratamento com IFN- γ inclui aspectos moduladores, com potencial antiinflamatório, da resposta das células HL-1. Nesse sentido, a presença de IFN- γ poderia resultar em diminuição de algumas respostas inflamatórias através de uma alça alternativa ao de recrutamento/ativação de células para o infiltrado inflamatório, que poderia colaborar com o bom funcionamento do coração por mais tempo.

Por se tratar de um modelo de análise da mecanística do IFN- γ no desafio por LPS e fazendo alusão à Doença de Chagas, outros estudos são necessários para determinar se o perfil de citocinas induzido pelo *priming* é reproduzido quando o desafio é feito pela própria infecção por *T. cruzi*. Nosso trabalho é, portanto, uma aproximação indireta no entendimento da biologia da doença, que poderá servir de base para possíveis intervenções no perfil de citocinas produzidas no coração em condições inflamatórias, visando minimizar a patologia e melhorar a qualidade de vida dos indivíduos acometidos pela doença.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho possibilitam concluir que o coração, e mais especificamente os cardiomiócitos, é capaz de produzir citocinas pró e anti-inflamatórias frente ao desafio de LPS e que essa produção é regulada para cima ou para baixo, dependendo da citocina em questão, pelo *priming* com IFN- γ . Além disso, o nosso trabalho sugere que algumas citocinas tidas como pró-inflamatórias, tal como o IFN- γ , podem desempenhar um papel anti-inflamatório no decorrer da resposta imune.

REFERÊNCIAS*

Akagawa KS, Komuro I, Kanazawa H, Yamazaki T, Mochida K, Kishi F. Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Respirology*. 2006;11 Suppl:S32-6.

Alvarez JM, Fonseca R, Borges da Silva H, Marinho CR, Bortoluci KR, Sardinha LR, Epiphanyo S, D'Imperio Lima MR. Chagas disease: still many unsolved issues. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:912965.

Aoyagi T, Matsui T. The Cardiomyocyte as a Source of Cytokines in Cardiac Injury. *J Cell Sci Ther*. 2012;2012(S5).

Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2006;177(6):3515-9.

Boyd JH, Mathur S, Wang Y, Bateman RM, Walley KR. Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response. *Cardiovasc Res*. 2006;72(3):384-93.

Brown MA, Jones WK. NF-kappaB action in sepsis: the innate immune system and the heart. *Front Biosci*. 2004;9:1201-17.

Cheng X, Liao YH, Zhang J, Li B, Ge H, Yuan J, Wang M, Lu B, Liu Y, Cheng Y. Effects of Atorvastatin on Th polarization in patients with acute myocardial infarction. *Eur J Heart Fail*. 2005;7(7):1099-104.

Chow NA, Jasenosky LD, Goldfeld AE. A distal locus element mediates IFN-gamma priming of lipopolysaccharide-stimulated TNF gene expression. *Cell Rep*. 2014;9(5):1718-28.

Claycomb WC, Lanson NA, Jr., Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ, Jr. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):2979-84.

Furrer A, Hottiger MO, Valaperti A. Absent in Melanoma 2 (AIM2) limits pro-inflammatory cytokine transcription in cardiomyocytes by inhibiting STAT1 phosphorylation. *Mol Immunol*. 2016;74:47-58.

Gu J, Sun R, Shen S, Yu Z. The influence of TLR4 agonist lipopolysaccharides on hepatocellular carcinoma cells and the feasibility of its application in treating liver cancer. *Onco Targets Ther*. 2015;8:2215-25.

Guillen I, Blanes M, Gomez-Lechon MJ, Castell JV. Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 beta and IL-6. *Am J Physiol*. 1995;269(2 Pt 2):R229-35.

*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

Han YL, Li YL, Jia LX, Cheng JZ, Qi YF, Zhang HJ, Du J. Reciprocal interaction between macrophages and T cells stimulates IFN-gamma and MCP-1 production in Ang II-induced cardiac inflammation and fibrosis. *PLoS One*. 2012;7(5):e35506.

Hayes MP, Freeman SL, Donnelly RP. IFN-gamma priming of monocytes enhances LPS-induced TNF production by augmenting both transcription and mRNA stability. *Cytokine*. 1995;7(5):427-35.

Henao-Martinez AF, Schwartz DA, Yang IV. Chagasic cardiomyopathy, from acute to chronic: is this mediated by host susceptibility factors? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106(9):521-7.

Hu X, Chakravarty SD, Ivashkiv LB. Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunol Rev*. 2008;226:41-56.

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;12:e29.

Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest*. 1995;96(2):1042-52.

Kapadia SR, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet GE, Mann DL. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ Res*. 1997;81(2):187-95.

Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Izawa A, Takahashi Y, Masumoto J, Koyama J, Hongo M, Noda T, Nakayama J, Sagara J, Taniguchi S, Ikeda U. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2011;123(6):594-604.

Lin L, Knowlton AA. Innate immunity and cardiomyocytes in ischemic heart disease. *Life Sci*. 2014;100(1):1-8.

Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH, Russell SW. Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J Biol Chem*. 1993;268(3):1908-13.

Ma X, Chow JM, Gri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF, Dzialo R, Trinchieri G. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med*. 1996;183(1):147-57.

Mann DL. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. *Circ Res*. 2011;108(9):1133-45.

Marchetti C, Toldo S, Chojnacki J, Mezzaroma E, Liu K, Salloum FN, Nordio A, Carbone S, Mauro AG, Das A, Zalavadia AA, Halquist MS, Federici M, Van Tassell

BW, Zhang S, Abbate A. Pharmacologic Inhibition of the NLRP3 Inflammasome Preserves Cardiac Function After Ischemic and Nonischemic Injury in the Mouse. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015;66(1):1-8.

Marinho CR, Bucci DZ, Dagli ML, Bastos KR, Grisotto MG, Sardinha LR, Baptista CR, Goncalves CP, Lima MR, Alvarez JM. Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a *Trypanosoma cruzi* clone: a model for genetic studies of Chagas' disease. *Infect Immun*. 2004;72(4):2350-7.

Marinho CR, Nunez-Apaza LN, Bortoluci KR, Bombeiro AL, Bucci DZ, Grisotto MG, Sardinha LR, Jorquera CE, Lira S, Lima MR, Alvarez JM. Infection by the Sylvio X10/4 clone of *Trypanosoma cruzi*: relevance of a low-virulence model of Chagas' disease. *Microbes Infect*. 2009;11(13):1037-45.

Mauer J, Chaurasia B, Goldau J, Vogt MC, Ruud J, Nguyen KD, Theurich S, Hausen AC, Schmitz J, Bronneke HS, Estevez E, Allen TL, Mesaros A, Partridge L, Febbraio MA, Chawla A, Wunderlich FT, Bruning JC. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat Immunol*. 2014;15(5):423-30.

Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, Seropian IM, Van Tassell BW, Salloum FN, Kannan HR, Menna AC, Voelkel NF, Abbate A. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(49):19725-30.

Murray HW. Interferon-gamma, the activated macrophage, and host defense against microbial challenge. *Ann Intern Med*. 1988;108(4):595-608.

Raberg L, Sim D, Read AF. Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. *Science*. 2007;318(5851):812-4.

Rangachari M, Mauermann N, Marty RR, Dirnhofer S, Kurrer MO, Komnenovic V, Penninger JM, Eriksson U. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J Exp Med*. 2006;203(8):2009-19.

Sanceau J, Wijdenes J, Revel M, Wietzerbin J. IL-6 and IL-6 receptor modulation by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha in human monocytic cell line (THP-1). Priming effect of IFN-gamma. *J Immunol*. 1991;147(8):2630-7.

Sandanger O, Ranheim T, Vinge LE, Bliksoen M, Alfsnes K, Finsen AV, Dahl CP, Askevold ET, Florholmen G, Christensen G, Fitzgerald KA, Lien E, Valen G, Espevik T, Aukrust P, Yndestad A. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2013;99(1):164-74.

Sun Y, Wu C, Ma J, Yang Y, Man X, Wu H, Li S. Toll-like receptor 4 promotes angiogenesis in pancreatic cancer via PI3K/AKT signaling. *Exp Cell Res*. 2016;347(2):274-82.

Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction. *Int Heart J.* 2014;55(2):101-5.

Valaperti A. Drugs Targeting the Canonical NF-kappaB Pathway to Treat Viral and Autoimmune Myocarditis. *Curr Pharm Des.* 2016;22(4):440-9.

Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.* 2000;60(2):203-12.

World Health Organization. Chagas Disease. [acesso em: 2016 set. 22]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> .