Alexandra Cifuentes Muñoz

**ESTUDO DO MODELO DE QUIMERAS DE
MEDULA ÓSSEA (WT/IFN γ R-KO) PARA
EXAMINAR O PAPEL DO IFN- γ SOBRE AS
CÉLULAS NÃO LEUCOCITÁRIAS NA INFECÇÃO
PELO *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Mestre em Ciências (Imunologia).

São Paulo
2008

Alexandra Cifuentes Muñoz

**ESTUDO DO MODELO DE QUIMERAS DE MEDULA
ÓSSEA (WT/IFN γ R-KO) PARA EXAMINAR O PAPEL
DO IFN- γ SOBRE AS CÉLULAS NÃO LEUCOCITÁRIAS
NA INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Imunologia).

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Maria Álvarez Mósig

São Paulo
2008

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

© reprodução parcial

Cifuentes Muñoz, Luisa Alexandra.

Estudo do modelo de quimeras de medula óssea (WT/IFN γ R-KO) para examinar o papel do IFN- γ sobre as células não leucocitárias na infecção pelo *Trypanossoma cruzi* / Luisa Alexandra Cifuentes Muñoz. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Álvarez Mósig, Jose Maria.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia das parasitoses-chagas.

Versão do título para o inglês: Analysis of the model of bone marrow chimeras (WT/IFN γ -R-KO) to examine the role of IFN γ upon non leukocytes in *Trypanosoma cruzi* infection.

Descritores: 1. IFN- gama 2. *Trypanosoma cruzi* 3. Células não leucocitárias 4. Quimeras de medula óssea 5. Resposta imune 6. I. Álvarez Mósig, Jose Maria II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB131/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luisa Alexandra Cifuentes Muñoz.

Título da Dissertação: Estudo do modelo de quimeras de medula óssea (WT/IFN γ R-KO) para examinar o papel do IFN γ sobre as células não leucocitárias na infecção pelo *Trypanossoma cruzi*.

Orientador(a): Jose Maria Álvarez Mósig.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Este trabalho foi realizado no laboratório de Imunologia das parasitoses do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro do CNPq (Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico), Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação - PEC-PG, processo número190464/2006-2.

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 - telex : (55) (011) 3091.7438
e-mail:

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 117 nas fls. 10 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Maria Alvarez Mosig, Coordenador da Linha de Pesquisa "***A interação trypanosoma cruzi-sistema imune do hospedeiro no modelo murino de doença de chagas crônica***" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Cláudio Romero Farias Marinho, Luiz Roberto Sardinha, Luiz Natividad Nuñez Apaza, Fernando Delgado Pretel, Tainá Mosca, Ricardo Martins dos Santos, Daniella Zanetti Bucci** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **23.11.2004**.

São Paulo, 24 de novembro de 2004.

Prof.ª. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438 e-mail: cepa@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</p>
---	---

Decl. CEEA.013/2006

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 117/04/CEEA, aprovo a inclusão dos alunos: **Alexandra Cifuentes Muñoz, André Luiz Bombeiro, Christian Emerson Rosas Jorquera** ao protocolo intitulado: "*A interação trypanosoma cruzi - sistema imune do hospedeiro no modelo murino de doença de chagas crônica*", para uso da espécie animal utilizado e métodos semelhantes, mediante solicitação do Prof. Dr. José Maria Alvarez Mosig, responsável pela linha de Pesquisa.

São Paulo, 25 de abril de 2006.

Profa. Dra. Marília C.L. Seeleander
Coordenadora da CEEA- ICB/USP

A Deus pela fortaleza,
Aos meus pais pela vida, apoio e incentivo,
À Lina e Sarah pela compreensão e espera,
A Fábio pelo amor, amizade e a dedicação,
Obrigada por estarem sempre do meu lado!
Com carinho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Meus sinceros agradecimentos
ao meu orientador
José Maria Álvarez Mósig “Pepe”,
pela disposição, compreensão e apoio.

AGRADECIMENTOS

A prof^a. Maria Regina D`Imperio Lima, pela colaboração e apoio no desenvolvimento do projeto.

Aos companheiros do laboratório: Christian, Fernando, Luiz Sardinha, Sergio, Luis Natividad, Sheyla, Daniela, Sandra, Claudia e Ana Paula pelo apoio.

A Dra. Luciana de Deus Vieira de Moraes, a Dra. Maria Carolina Quartim B Elias Sabbaga e o Dr.Niels Olsen Saraiva Câmara, pelas pertinentes críticas e sugestões no Exame de Qualificação.

A todos os professores do Departamento de Imunologia, pela colaboração e ensinamentos transmitidos.

A Silvia, Regina e Thais e todos os funcionários do biotério pelo fornecimento e cuidado dos animais.

A Rogério Silva, especial agradecimento não somente pela preparação dos materiais, mas também pela colaboração e disposição para as irradiações. Pela força nos momentos difíceis. Obrigada pela constante ajuda.

A Meire, obrigada pela simpatia. Por manter o laboratório sempre em ordem. Pela convivência alegre e divertida.

Ao Paulo Albe por toda ajuda no processamento dos órgãos e obtenção dos cortes histológicos.

Ao meu querido amigo André pelo apoio, amizade, sinceridade e carinho. Por me dar força nos momentos que mais necessitei.

A todos os que de alguma forma ajudaram-me na realização deste projeto.

RESUMO

Muñoz AC. Estudo do modelo de quimeras de medula óssea (WT/IFN γ R-KO) para examinar o papel do IFN- γ sobre as células não leucocitárias na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* [Dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Conhecemos o papel dos leucócitos no controle do *Trypanosoma cruzi*, mas ignoramos qual a contribuição das populações estruturais (miócitos, hepatócitos, etc). Estas populações poderiam sinalizar a presença do parasita e/ou ter ação efetora que poderia aumentar em resposta a citocinas como o IFN- γ . Para verificar se as células estruturais respondem ao IFN γ contribuindo à destruição do *T. cruzi*, analisamos a infecção em quimeras WT/IFN γ R-KO (WT/KO) geradas em camundongos IFN γ R-KO reconstituídos com medula óssea de camundongos selvagens (WT), nas quais parte dos leucócitos é IFN γ R⁺, mas as células não leucocitárias são deficientes. Quimeras WT/KO e quimeras controle WT/WT foram estudadas em relação à carga parasitária e inflamação. O parasitismo sistêmico e tissular é maior nas quimeras WT/KO do que nas quimeras WT/WT, mas inferior à dos controles IFN γ R-KO. Nos animais WT/KO o aumento de ninhos no coração e músculo não se acompanha de aumento no infiltrado leucocitário. Os resultados sugerem que as células não leucocitárias contribuem à defesa frente ao *T. cruzi*.

Palavras-chave: IFN – gama; *T. Cruzi*; Células não leucocitárias; Quimeras de medula óssea; Resposta imune; Quimeras WT/IFN γ R-KO.

ABSTRACT

Muñoz AC. Analysis of the bone marrow chimera model (WT/IFN γ R-KO) to examine the role of IFN- γ upon non leukocytes in *Trypanosoma cruzi* infection [Dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Although we know the role played by leukocytes in *Trypanosoma cruzi* control, we ignore the contribution of structural cells (myocytes, hepatocytes, etc). These cells could signal the presence of the parasite and/or mediate an effector activity which could increase in response to cytokines, as IFN- γ . To evaluate if non-leukocytes respond to IFN γ , contributing to *T. cruzi* destruction, we analysed the infection in WT/IFN γ R-KO (WT/KO) chimaeras, generated in IFN γ R-KO mice reconstituted with bone marrow of wild-type mice (WT) so that most leukocytes are IFN γ R⁺ but structural cells are deficient. WT/KO chimaeras and control WT/WT chimaeras were infected by *T. cruzi* and the parasite load and inflammation analyzed in various organs. Systemic and tissue parasite loads were higher in WT/KO chimeras than in WT/WT chimeras, but lower than in control IFN γ R-KO mice. In WT/KO chimaeras the increased parasite load at the heart and skeletal muscle was not followed by an increase of inflammatory infiltrates. Our results suggest that structural cells contribute to *T. cruzi* control.

Key words: IFN – gamma; *T. Cruzi*; non-leukocyte cells; Bone-marrow chimeras; Immune response; WT/IFN γ R chimeras.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Análise da frequência de células IFN γ R ⁺ nas populações de células CD3 ⁺ e B220 ⁺ nos camundongos da 1 ^a experiência.....	47
Figura 2 - Percentagem de reconstituição de células CD3 ⁺ IFN γ R ⁺ e B220 ⁺ IFN γ R ⁺ da 1 ^a experiência.....	48
Figura 3 - Análise comparativa da carga parasitária sistêmica (sangue) em camundongos controle positivo (WT), controle negativo (IFN γ R-KO), quimera WT/WT e quimera WT/KO da 1 ^a experiência.....	50
Figura 4 - Análise comparativa do número de ninhos presentes no tecido cardíaco nos animais do grupo controle KO, grupo controle WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 1 ^a experiência.....	53
Figura 5 - Análise comparativa do infiltrado cardíaco nos animais do grupo controle KO, grupo controle WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 1 ^a experiência-.....	54
Figura 6 - Análise comparativa do número de ninhos presentes no fígado dos animais do grupo controle KO, grupo controle WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 1 ^a experiência.....	56
Figura 7 - Análise comparativa da intensidade de hepatite nos animais do grupo controle KO, grupo controle WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 1 ^a experiência.....	57
Figura 8 - Análise comparativa do número de ninhos presentes no músculo estriado esquelético nos animais do grupo controle KO, grupo controle WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 1 ^a experiência.....	58
Figura 9 - Análise comparativa do infiltrado inflamatório no músculo estriado esquelético nos animais do grupo controle KO, grupo controle WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 1 ^a experiência.....	59
Figura 10 - Análise da frequência de células IFN γ R ⁺ nas populações de células CD3 ⁺ e B220 ⁺ nos camundongos da 2 ^a experiência.....	61
Figura 11 - Segunda avaliação da frequência de células IFN γ R ⁺ nas populações de células CD3 ⁺ e B220 ⁺ nos camundongos da 2 ^a experiência.....	62
Figura 12 - Percentagem de reconstituição de células CD3 ⁺ IFN γ R ⁺ e B220 ⁺ IFN γ R ⁺ da 2 ^a experiência.....	63

Figura 13 - Análise comparativa da carga parasitaria sistêmica (sangue) nos grupos controle negativo (IFN γ R-KO), controle positivo (WT), quimera WT/WT e quimera WT/KO 2ª experiência.....	64
Figura 14 - Análise comparativa do número de ninhos presentes no tecido cardíaco dos animais do grupo controle KO, grupo controle WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 2ª experiência.....	67
Figura 15 - Análise comparativa do infiltrado cardíaco nos animais do grupo controle negativo KO, grupo controle positivo WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 2ª experiência.....	67
Figura 16 - Análise comparativa do número de ninhos presentes no fígado nos animais do grupo controle negativo KO, grupo controle positivo KO, grupo quimera WT/WT e WT/KO da 2ª experiência.....	68
Figura 17 - Análise comparativa da intensidade de hepatite nos animais do grupo controle negativo KO, grupo controle positivo WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 2ª experiência.....	69
Figura 18 - Análise comparativa do número de ninhos presentes no músculo estriado esquelético nos animais do grupo controle negativo KO, grupo controle positivo WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 2ª experiência.....	69
Figura 19 - Análise comparativa do infiltrado inflamatório no músculo estriado esquelético nos animais do grupo controle negativo KO, grupo controle WT, grupo quimera WT/WT e grupo quimera WT/KO 2ª experiência.....	70
Figura 20 - Análise da frequência de células IFN γ R ⁺ nas populações de células CD3 ⁺ e B220 ⁺ nos camundongos da 3ª experiência.....	72
Figura 21 - Percentagem de reconstituição de células CD3 ⁺ IFN γ R ⁺ e B220 ⁺ IFN γ R ⁺ da 3ª experiência.....	74
Figura 22 - Análise comparativa da carga parasitaria em camundongos dos grupos controle negativo (IFN γ R-KO), controle positivo (C57BL/6), quimera WT/WT e quimera WT/KO da 3ª experiência.....	75
Figura 23 - Correlação entre o nível de reconstituição e número de parasitas circulantes no sangue de animais WT/KO da 3ª experiência.....	76
Figura 24 - Analise comparativa do número de ninhos e infiltrados	

inflamatórios presentes no coração dos animais da 3ª experiência.....	80
Figura 25 - Análise comparativa entre número de ninhos e número de infiltrados inflamatórios no coração dos animais da 3ª experiência.....	82
Figura 26 - Análise comparativa do número de ninhos e infiltrados inflamatórios presentes no fígado dos animais da 3ª experiência.	83
Figura 27 - Análise comparativa do número de ninhos e infiltrado inflamatórios presentes no músculo estriado esquelético nos animais da 3ª experiência.....	84
Figura 28 - Análise da frequência de células IFN γ R ⁺ nas populações de células CD3 ⁺ e B220 ⁺ nos camundongos da 4ª experiência.....	86
Figura 29 - Percentagem de reconstituição de células CD3 ⁺ IFN γ R ⁺ e B220 ⁺ IFN γ R ⁺ da 4ª experiência.	87
Figura 30 - Análise comparativa da carga parasitaria em camundongos dos grupos controle negativo (IFN γ R-KO), controle positivo (C57BL/6), quimera WT/WT e quimera WT/KO da 4ª experiência.	89
Figura 31 - Correlação entre o nível de reconstituição e número de parasitas circulantes no sangue dos animais WT/KO da 4ª experiência.....	91
Figura 32 - Análise comparativa do número de ninhos e infiltrados inflamatórios presentes no coração dos animais da 4ª experiência.	92
Figura 33 - Correlação entre parasitemias e número de ninhos presentes no coração dos animais da 4ª experiência.	93
Figura 34 - Análise comparativa entre número de ninhos e número de infiltrados inflamatórios no coração dos animais da 4ª experiência.....	94
Figura 35 - Análise comparativa do número de ninhos e infiltrados inflamatórios presentes no fígado dos animais da 4ª experiência.	95
Figura 36 - Análise comparativa do número de ninhos e infiltrados inflamatórios presentes no músculo estriado esquelético nos animais da 4ª experiência.	96
Figura 37 – Patologia cardíaca (aurícula).	99
Figura 38 – Patologia cardíaca (aurícula).....	100
Figura 39 – Patologia cardíaca.....	101
Figura 40 – Patologia hepática.....	102
Figura 41 – Patología da musculatura esquelética estriada.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da 1ª experiência. Quimeras em fundo C57BL/6. Infecção com T. cruzi da cepa Sylvio X10/4.....	52
Tabela 2 - Resultados da 2ª experiência. Quimeras em fundo C57BL/6. Infecção com T. cruzi da cepa Y.....	66
Tabela 3 - Resultados da 3ª experiência. Quimeras em fundo C57BL/6. Infecção com T. cruzi da cepa Y.....	78
Tabela 4 - Resultados da 4ª experiência. Quimeras em fundo C57BL/6. Infecção com T. cruzi da cepa Sylvio X10/4.....	98
Tabela 5 - Estatística dos resultados de WT/KO (em relação à WT/WT)	104
Tabela 6 - Estatística dos resultados de WT/KO (em relação à KO).....	105

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Aspectos gerais e ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
1.2	Mecanismos imunopatológicos da Doença de Chagas.....	24
1.3	Mecanismos efectores da resposta imune no coração infectado pelo <i>T. cruzi</i>	25
1.4	O papel sinalizador e efetor das células não leucocitárias no coração infectado pelo <i>T. cruzi</i>	26
1.5	O papel fundamental do IFN- γ na infecção pelo <i>T. cruzi</i> : efeitos sistêmicos e locais.....	28
1.6	Particularidades da infecção pelo <i>T. cruzi</i> das cepas Sylvio X10/4 e Y.....	29
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	Objetivo principal.....	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	ABORDAGEM EXPERIMENTAL.....	34
4	DETALHAMENTO EXPERIMENTAL.....	36
4.1	Obtenção das quimeras e relação de quimeras pretendidas.....	37
4.2	Avaliação do estado quimérico.....	38
4.3	Estudos pretendidos nas quimeras.....	38
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
5.1	Animais.....	40
5.2	Preparação das quimeras.....	40
5.2.1	Coleta de células da medula óssea.....	40
5.2.2	Irradiação.....	41
5.2.3	Reconstituição.....	41
5.2.3.1	Avaliação do grau de reconstituição.....	41
5.3	Infecção com <i>T. cruzi</i>	42
5.4	Avaliação de parasitemias, carga parasitária local e análise histopatológica.....	43
5.5	Análise estatística.....	44
6	RESULTADOS.....	45

6.1	1ª EXPERIÊNCIA: Avaliação do estado quimérico.....	46
6.2	1ª EXPERIÊNCIA: Avaliação da infecção pelo <i>T. cruzi</i>	49
6.3	2ª EXPERIÊNCIA: Avaliação do estado quimérico.....	60
6.4	2ª EXPERIÊNCIA: Avaliação da infecção pelo <i>T. cruzi</i>	63
6.5	3ª EXPERIÊNCIA: Avaliação do estado quimérico.....	71
6.6	3ª EXPERIÊNCIA: Avaliação da infecção pelo <i>T. cruzi</i>	74
6.7	4ª EXPERIÊNCIA: Avaliação do estado quimérico.....	85
6.8	4ª EXPERIÊNCIA: Avaliação da infecção pelo <i>T. cruzi</i>	88
7	DISCUSSÃO.....	106
8	CONCLUSÕES.....	112
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
	ANEXO A - 3ª EXPERIÊNCIA: Avaliação do estado quimérico (excluídos os animais que apresentaram baixa percentagem de reconstituição).....	122
	Figura A.1 - Frequência de células IFN γ R ⁺ nas populações de células CD3 ⁺ e B220 ⁺ nos camundongos da 3ª experiência, excluídos os animais que apresentaram baixa percentagem de reconstituição.....	122
	Figura A.2 – Percentagem de reconstituição de células CD3 ⁺ IFN γ R ⁺ e B220 ⁺ IFN γ R ⁺ da 3ª experiência, excluindo os animais que apresentaram baixa percentagem de reconstituição respeito às duas populações.....	123
	ANEXO B - 3ª EXPERIÊNCIA: Avaliação da infecção pelo <i>T. cruzi</i> (excluídos os animais com baixa percentagem de reconstituição).....	124
	Figura B.1 – Análise comparativa da carga parasitaria em camundongos dos grupos controle negativo (IFN γ R-KO), controle positivo (C57BL/6), quimera WT/WT e quimera WT/KO da 3ª experiência, excluindo os animais que apresentaram baixa percentagem de reconstituição.....	124
	Figura B.2 – Correlação entre o nível de reconstituição e número de parasitas circulantes no sangue de animais WT/KO da 3ª experiência, excluindo os animais que apresentaram baixa percentagem de reconstituição.....	125
	Figura B.3 – Analise comparativa do número de ninhos e	

infiltrados inflamatórios presentes no coração dos animais da 3ª experiência, excluindo os animais que apresentaram baixa percentagem de reconstituição.....	126
Figura B.4 – Análise comparativa entre número de ninhos e número de infiltrados inflamatórios no coração dos animais da 3ª experiência, excluindo os animais que apresentaram baixa percentagem de reconstituição.....	127
Figura B.5 – Análise comparativa do número de ninhos e infiltrados inflamatórios presentes no fígado dos animais da 3ª experiência, excluindo os animais que apresentaram baixa percentagem de reconstituição.....	128
Figura B.6 – Análise comparativa do número de ninhos e infiltrados inflamatórios presentes no músculo estriado esquelético nos animais da 3ª experiência, excluindo os animais que apresentaram baixa percentagem de reconstituição.....	129
ANEXO C - Tabela de comparação das diferenças estatísticas observadas na 1ª e 2ª análise da 3ª experiência. Quimeras em fundo C57BL/6. Infecção com T. cruzi da cepa Sylvio X10/4.....	130

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

Descrita por Carlos Chagas há quase um século (CHAGAS, 1909), a Doença de Chagas constitui ainda um grande problema de saúde pública em –América Latina, estando presente em 18 países do continente americano. Calcula-se que 9 milhões de pessoas estejam infectadas e que aproximadamente 40 milhões corram o risco de contrair a doença nas áreas endêmicas. (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2005).

O agente etiológico da doença de Chagas é o *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, um protozoário heteroxênico, que apresenta no hospedeiro invertebrado, o triatomíneo, as formas epimastigota e tripomastigota metacíclica, e no hospedeiro vertebrado, as formas amastigota e tripomastigota sanguícola. O hospedeiro invertebrado, o "barbeiro", é um inseto hematófago de hábito noturno, da sub-família *Triatominae*, que se alimenta exclusivamente de vertebrados homeotérmicos. A transmissão do parasita ao homem se dá frequentemente pela picada do barbeiro, mas outras formas de transmissão, tais como a placentária, a por transfusão de sangue e hemoderivados, a digestiva e a acidental ou de laboratório, são também possíveis. O "barbeiro", ao picar uma pessoa ou animal infectado, suga, juntamente com o sangue, as formas de *T. cruzi*. Os tripanossomas chegam ao intestino do "barbeiro" onde se multiplicam, sendo eliminados através das fezes ou urina. Após novo repasto sanguíneo de um barbeiro infectado, os tripomastigotas metacíclicos das fezes ou urina são depositados sobre a pele da pessoa. Geralmente, a picada provoca coceira, lesionando a pele e facilitando a penetração do parasita pelo local da picada. O *T. cruzi* contido nas fezes do "barbeiro" pode também penetrar pela mucosa dos olhos, nariz e boca, ou através de feridas ou cortes recentes existentes na pele (DIAS, 1986). Uma vez no hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos invadem diversos tipos de células, se transformando na forma replicativa intracelular chamada amastigota, que através de divisão binária gera um ninho ou pseudocisto. Completado o ciclo de replicação, a ruptura do ninho libera os tripomastigotas sanguícolas que através do meio extracelular e sangue propiciam a disseminação do parasita.

A doença de Chagas pode ser classificada em aguda e crônica. A fase aguda caracteriza-se por se apresentar com febre, mal estar, falta de apetite, edemas localizados na pálpebra (sinal de Romanha) ou em outras partes do corpo (chagoma de inoculação), infartamento de gânglios, linfadenopatia generalizada e hepatoesplenomegalia leve ou moderada (DIAS et al., 1956). Outra manifestação clínica observada na fase aguda pode ser a miocardite difusa, que pode estar acompanhada ou não de pericardite serosa e/ou endocardite. Nesta fase os parasitos se multiplicam de forma exponencial e podem ser detectados na corrente sanguínea e sob a forma de ninhos em tecidos, principalmente no tecido muscular. Em crianças, o quadro pode se agravar e levar à morte. Frequentemente, entretanto, não há qualquer manifestação clínica da doença nesta fase, podendo passar despercebida.

Após a fase aguda, o número de parasitas na corrente sanguínea cai dramaticamente pela acentuada resposta imunológica no indivíduo, dando início às fases indeterminada e crônica da infecção.

A fase indeterminada, que se apresenta no período de transição entre a fase aguda a crônica, ou que pode perdurar pela vida do hospedeiro, caracteriza-se por ausência de parasitemia patente e de sinais clínicos, eletrocardiográficos e radiológicos. O coração, esôfago e cólon mostram aspecto normal, sendo a parasitemia somente detectada por hemocultura, xenodiagnóstico ou PCR. Estudos epidemiológicos em áreas endêmicas revelaram que 50-60% dos pacientes cronicamente infectados permanecem nesta forma. Cerca de 10% dos pacientes desenvolvem a forma sintomática digestiva que envolve aperistalse e dilatação do esôfago e/ou intestino, dando origem a megaesôfago e/ou megacólon. Finalmente, 20- 30% dos pacientes, após períodos de até 10 anos, evoluem para a forma crônica cardíaca. Durante a fase crônica os pacientes podem passar um longo período, ou mesmo toda a sua vida, sem apresentar nenhuma manifestação da doença, embora sejam portadores do *T. cruzi*. Em outros casos, a doença prossegue ativamente, passada a fase inicial, podendo comprometer diversos setores do organismo, salientando-se o coração e o aparelho digestivo (DIAS et al., 1956).

A lesão no coração é caracterizada por infiltrados de células mononucleares, destruição de fibras musculares e fibrose intersticial. A intensidade do infiltrado inflamatório, não é proporcional à frequência ou ao tamanho dos ninhos do parasita, extremamente escasso no tecido cardíaco na fase crônica. Lesões significativas podem levar à insuficiência cardíaca congestiva. Mais ainda, as alterações da função cardíaca, anormalidades de condução e episódios de arritmias, predis põem os pacientes chagásicos à morte súbita (DIAS et al., 1956). Uma vez que a morbidez da infecção pelo *T. cruzi* decorre fundamentalmente da disfunção cardíaca o estudo da fisiopatologia deste órgão, assim como o estudo dos mecanismos efetores do sistema imune no próprio tecido cardíaco, merecem destaque especial.

1.2 Mecanismos imunopatológicos da Doença de Chagas

O *T. cruzi*, protozoário responsável pela Doença de Chagas humana, tem potencial de infectar uma ampla gama de células, apesar de mostrar freqüentemente uma preferência por células musculares (cepas miotrópicas) ou por células da estirpe macrófaga (cepas reticulotrópicas) (BICE e ZELEDON, 1970; BRENER, 1973).

O coração é um dos órgãos que podem ser colonizados pelo *T. cruzi*, sendo que o parasita pode invadir cardiomiócitos, fibroblastos, adipócitos, células endoteliais e macrófagos tissulares, ou seja, todas as populações celulares estruturais e residentes do tecido cardíaco. Na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, a miocardite é uma das alterações patológicas mais freqüentemente encontradas, tanto em humanos como em camundongos. (FUENMAYOR et al., 2005; ELIZARI, 1999; ANDRADE, 1983; ANDRADE et al., 1994; RIBEIRO, 2002).

Por outro lado, como citamos acima, em 20-30% das pessoas infectadas, assim como em alguns dos modelos experimentais murinos, há desenvolvimento de um quadro crônico de miocardite. Este quadro crônico foi considerado por muito tempo como de natureza auto-imune (CUNHA-NETO et al., 1996; VAN VOORHIS; EISEN,

1989; MINOPRIO, 2001), mas estudos recentes sugerem que seja principalmente o resultado da atividade efetora continuada frente aos *T. cruzi* que persistem no local (TARLETON, 2001; PALOMINO et al., 2000; VAGO et al., 1996; ANEZ et al., 1999; MARINHO et al., 2004).

A persistência do parasita no coração do hospedeiro crônico pode ser consequência da entrada contínua de parasitas a partir do sangue e/ou, mais provavelmente, da ineficiência da resposta imune local que não conseguindo a destruição completa dos parasitas, permite que parte dos tripomastigotas liberados na ruptura de um ninho venha a colonizar secundariamente as células vizinhas.

Mas qual a atividade efetora frente ao *T. cruzi* no coração do hospedeiro aguda ou cronicamente infectado?

1.3 Mecanismos efetores da resposta imune no coração infectado pelo *T. cruzi*

A atividade efetora frente aos *T. cruzi* presentes no coração é mediada pelos elementos do sistema imune recrutados, o que abrange populações celulares das séries linfocitária e monocitária e fatores solúveis, como anticorpos, complemento e outros elementos humorais. O nosso conhecimento da atividade efetora no coração infectado é em grande parte uma extrapolação, a partir de estudos *in vitro* e sistêmicos, sobre os achados de celularidade diferencial e citocinas produzidas no coração infectado. Assim, o controle local das formas extracelulares, liberadas como consequência da ruptura espontânea de um ninho, acredita-se que ocorra pela ação dos anticorpos específicos IgG (RODRIGUEZ et al., 1981) com atividade opsonizante (que possibilitam a fagocitose por macrófagos) e/ou ativadora de complemento (que possibilitam a opsonização e permitem a liberação de anafilotoxinas, moléculas indutoras de inflamação e recrutamento de leucócitos). Por outro lado, a destruição das células parasitadas e a potencialização da destruição do *T. cruzi* no interior dos macrófagos residentes ou recrutados, são funções

respectivamente atribuídas aos linfócitos T CD8⁺ e aos linfócitos T CD4⁺ com perfil funcional TH1 (ROTTENBERG et al.,1993; TARLETON et al., 1992; RUSSO et al.,1996).

Finalmente, o recrutamento de macrófagos e linfócitos ao coração infectado, resultado da secreção de quimiocinas por diversas populações celulares (MACHADO et al., 2005; HARDISON et al., 2006), é considerado elemento fundamental na atividade efetora celular. Neste contexto, a ativação de macrófagos pelo IFN γ produzido por linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e T $\gamma\delta$ ⁺, assim como também pelas células “natural killer” (NK) (SARDINHA et al., 2006; CARDILLO et al.,1996) resulta em aumento da atividade tripanocida, um efeito mediado, ao menos em parte, através da produção de óxido nítrico (GAZZINELLI et al., 1996). No entanto, apesar destes elementos do sistema imune ser considerados efetivos na destruição sistêmica do *T. cruzi* desconhecemos a singularidade de sua ação no tecido cardíaco, assim como a sua variabilidade nos diferentes indivíduos e sua efetividade sobre parasitas de diferentes cepas. De qualquer forma, como citado acima, em uma fração dos indivíduos infectados este conjunto de mecanismos efetores parece insuficiente para determinar a destruição completa dos parasitas que persistem no tecido cardíaco (TARLETON, 2001; PALOMINO et al., 2000; VAGO et al., 1996; ANEZ et al., 1999; MARINHO et al., 2004). Caso exista uma contribuição de um componente autoimune à patologia cardíaca, anticorpos e clones de linfócitos T específicos para antígenos próprios devem se somar aos elementos reativos frente ao parasita na sua ação lesiva direta ou promotora de recrutamento de células fagocíticas.

1.4 O papel sinalizador e efector das células não leucocitárias no coração infectado pelo *T. cruzi*

O quadro das populações efectoras descrito acima é completo? Há participação das populações não leucocitárias residentes no coração? Comumente, o papel das

populações estruturais (cardiomiócitos, fibroblastos, adipócitos, células endoteliais) é ignorado, sendo exclusivamente consideradas alvos da infecção pelo parasita e/ou de destruição pelos mecanismos efetores da resposta imune. No entanto, nos últimos anos, estudos *in vitro*, assim como estudos de hibridização *in situ* com sondas para mRNA, tem mostrado que células não leucocitárias produzem mediadores imunológicos, sugerindo que poderiam participar ativamente como elementos sinalizadores da presença de patógenos (CHANDRASEKAR, et al., 1998a.; CHANDRASEKAR, et al., 1998b.; FICHERA, et al., 2004; HUANG, et al., 2000; MACHADO et al., 2000). Assim, a sinalização da presença do *T. cruzi* no coração infectado poderia acontecer, não somente através dos macrófagos (histiócitos) e células dendríticas residentes (HARDISON et al., 2006), mas também pela ação das células estruturais acima citadas. *A priori*, mediadores solúveis como quimiocinas, citocinas, derivados do ácido araquidônico, bradicinina, endotelina, etc, poderiam estar envolvidos na sinalização da presença do *T. cruzi* por células estruturais. Experimentos *in vitro* (MACHADO et al., 2000; FICHERA et al., 2004; CHANDRASEKAR et al., 1998a; HUANG et al., 2000) e *in vivo* (CHANDRASEKAR et al., 1998b) têm mostrado que cardiomiócitos produzem citocinas e quimiocinas, assim como alteram a sua expressão de proteínas de membrana quando infectados pelo parasita. Em forma similar, fibroblastos infectados pelo *T. cruzi* produzem IFN α/β (VAENA DE AVALOS et al., 2002), sendo que nestas células o parasita ativa vias de sinalização celular diferentes às utilizadas pelos miócitos (HALL et al., 2000). Por outro lado, após o recrutamento de leucócitos, as células estruturais infectadas tornam-se alvo da ação de células citotóxicas CD8⁺, ao sinalizarem a presença intracelular do parasita através da expressão de peptídeos do parasita nas moléculas do MHC de classe I.

Aprofundando-nos na hipótese da participação na resposta imunológica das células não leucocitárias, cabe ainda a possibilidade das populações estruturais do coração desempenhar, não somente uma função sinalizadora, mas também uma ação efetora frente ao *T. cruzi*. Será que no coração infectado não há participação direta das células estruturais como elementos que limitam a replicação do parasita? Sabemos que a enzima iNOS pode ser detectada *in vivo* nas fibras musculares do animal infectado, mas será que outros mediadores com atividade anti-parasita não poderiam ser também produzidos? Machado e col. mostraram através de

experimentos *in vitro* que o IFN γ potencializa a produção de óxido nítrico por cardiomiócitos embrionários murinos infectados pelo *T. cruzi*, resultando secundariamente em uma maior destruição do parasita (MACHADO et al., 2000). Assim, um papel efetor das células não leucocitárias poderia acontecer como consequência da própria infecção pelo parasita, ou, indiretamente, em resposta às citocinas (como o IFN γ) produzidas por linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e outras populações celulares. Nos macrófagos, o IFN γ , além de um potente indutor de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, possui ação sinalizadora / recrutadora de células, ao induzir a produção secundária das quimiocinas CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC (ZHAO et al., 2002).

Neste contexto existe a possibilidade das populações estruturais do coração, responderem a IFN γ produzido por outras células, não somente através da produção de óxido nítrico (atividade efetora), mas também através da produção de quimiocinas que aumentariam o recrutamento celular (atividade efetora/sinalizadora) (SANA et al., 2005).

1.5 O papel fundamental do IFN- γ na infecção pelo *T. cruzi*: efeitos sistêmicos e locais

O IFN γ é provavelmente a citocina mais importante no controle do *T. cruzi*. Prova da sua notável importância é o efeito devastador da sua ausência ou do seu bloqueio em modelos murinos de infecção (CARDILLO et al., 1996; SARDINHA et al., 2006; MARINHO et al., 2007). Curiosamente, utilizando parasitas da cepa Colombiana foi mostrado que camundongos deficientes em IFN γ são até mais susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi* do que animais deficientes em MyD88, molécula adaptadora fundamental na progressão do sinal gerado após o reconhecimento do parasita por diversos receptores TLR (CAMPOS et al., 2004).

O papel protetor do IFN γ na infecção pelo *T. cruzi* decorre de um amplo leque de ações que inclui: a) ativação de macrófagos, que como citamos acima, advém da indução de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, duas moléculas com potente ação

tripanocida (GAZZINELLI et al., 1992; MUNOZ-FERNANDEZ et al., 1992); b) indução de moléculas de classe II, moléculas coestimuladoras e TLRs por células dendríticas e macrófagos o que possibilita uma eficiente apresentação antigênica dos antígenos do parasita (SCHRODER et al., 2007); c) adoção do perfil funcional TH1; d) na resposta humoral, o IFN γ promove a mudança de classe para aquelas subclasses de IgG dotadas de maior atividade opsonizadora e ativadora do complemento (BOSSIE e VITETTA, 1991); a respeito disso, nosso grupo têm recentemente mostrado que camundongos IFN γ -KO infectados por *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4 desenvolvem uma resposta IgG dominada por IgG1 e com ausência de IgG2a (MARINHO et al., 2007); e) este ultimo efeito do IFN γ vê-se complementado pela indução de Fc γ RI por macrófagos (GUYRE, 1983), receptor que possibilita a remoção dos tripomastigotas recobertos de IgG2a (UMEKITA e MOTA, 2000); e f) indução secundária das quimiocinas Mig, IP-10 e ITAC por diversos tipos celulares.

Além destes efeitos e como citado acima, existem dados na literatura que sugerem que na infecção pelo *T. cruzi* o IFN γ promove a atividade efetora das células não leucocitárias. Assim, o IFN γ estimula a produção de óxido nítrico por cardiomiócitos embrionários murinos infectados e, secundariamente, promove uma redução marcada do número de *T. cruzi* (MACHADO et al., 2000). Resta saber se esta atividade efetora também acontece *in vivo*, no coração e outros órgãos, como fígado e músculo esquelético, do indivíduo infectado pelo *T. cruzi*.

1.6 Particularidades da infecção pelo *T. cruzi* das cepas SylvioX10/4 e Y

O *T. cruzi* apresenta uma grande diversidade de cepas que diferem no seu tropismo celular preferencial e na sua resistência a alguns dos mecanismos da resposta imune (ALCÂNTARA e BRENER, 1978). Por quase uma década o nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com os parasitas das cepas Y e Sylvio X10/4. A cepa Y (SILVA e NUSSENZWIEG, 1953) pertence ao grupo genético II de *T. cruzi*, frequentemente envolvido na infecção peri-domiciliar, e constitui uma das cepas mais utilizadas nos modelos experimentais de infecção em camundongos e ratos. O

T. cruzi Y induz altos níveis de parasitemia e mortalidade na maioria das linhagens de camundongo (SARDINHA et al., 2006). No entanto, os camundongos da linhagem C57BL/6 são relativamente resistentes (COSTA et al., 2006; SEBASTIAN, 2003) e conseguem sobreviver a inóculos de até 1000 tripomastigotas sanguícolas. Nesta dose, a infecção resulta em parasitemia moderada que atinge seu pico nos dias 11-12 e declina posteriormente até não ser mais patente no exame direto. No entanto, como na doença humana, o parasita persiste em níveis sub-patentes por toda a vida do hospedeiro. Na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* Y observam-se escassos ninhos no coração e músculo esquelético do camundongo C57BL/6, que, no entanto, desenvolve uma miocardite moderada/intensa que tem seu pico por volta do dia 15-16 de infecção (SARDINHA et al., 2006; e dados não publicados). No entanto, na fase crônica da infecção por parasitas da cepa Y e independentemente da linhagem de camundongo, os níveis de miocardite e miosite são muito baixos, se não inexistentes.

Por outro lado, o parasita Sylvio X0/4 constitui um clone de *T. cruzi* que é normalmente mantido *in vitro* em cultura de células. Este parasita pertence ao grupo genético I, freqüentemente envolvido no ciclo selvático de infecção, e foi isolado de um triatomídeo utilizado no xenodiagnóstico em um paciente do Pará (Brasil) (SILVEIRA et al., 1979). No nosso laboratório observamos que este parasita não induz parasitemias patentes em camundongos imunocompetentes, mas induz níveis elevados de parasitemia no camundongo IFN γ -KO (MARINHO et al., 2007). No camundongo C57BL/6, a infecção por 10⁵ *T. cruzi* Sylvio X10/4 induz níveis discretos de miocardite e miosite, com escassos ninhos, por volta do dia 18 pós-infecção (dados não publicados), enquanto que no camundongo IFN γ -KO resulta em patologia intensa e precoce no coração e músculo esquelético com destaque para um alto número de ninhos de amastigotas (MARINHO et al., 2007). De interesse, apesar de se tratar de um parasita aparentemente pouco virulento para o animal imunocompetente, temos mostrado que na linhagem de camundongos C3H/HePAS o *T. cruzi* Sylvio X10/4 induz uma miocardite crônica intensa que apresenta características similares à miocardite crônica da doença de Chagas humana (MARINHO et al., 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

O presente projeto tem como objetivo avaliar se o modelo experimental de quimeras de medula óssea é adequado para analisar o papel do IFN-gama (IFN γ) sobre as populações estruturais (não leucocitárias) do coração, músculo esquelético e fígado, na infecção pelo *T. cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

Analisar a susceptibilidade à infecção por parasitas de duas cepas distintas de *T. cruzi* em animais deficientes especificamente de IFN γ -R nas células não-leucocitárias (WT/KO), assim como nos diferentes controles, animais IFN γ R-KO (KO), animais WT e quimeras WT/WT. A susceptibilidade será avaliada pelo:

- A- grau de parasitemia;
- B- número de ninhos no coração, fígado e músculo esquelético;
- C- grau de infiltração leucocitária nestes órgãos.

Uma vez que o coração é o órgão mais freqüentemente afetado na doença de Chagas crônica humana, uma ênfase especial deverá ser dada ao estudo da carga parasitária (número de ninhos) e infiltração leucocitária neste órgão.

Por tanto focamos os conseqüentes aspectos:

1. Examinar, a nível sistêmico, se os animais WT/KO são mais resistentes ao *T. cruzi* do que os animais IFN γ R-KO (KO);
2. Examinar, a nível sistêmico, se os animais WT/KO manifestam maior susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* do que os animais WT/WT;
3. Averiguar, nos três órgãos de estudo, se as células não leucocitárias contribuem ao controle local do parasita pela sua resposta ao IFN γ ;

4. Verificar se as células não leucocitárias dos órgãos em estudo respondem ao IFN γ potenciando o recrutamento celular;
5. Analisar se nos animais WT/KO existe correlação entre o nível de reconstituição por leucócitos IFN γ R⁺ e a intensidade do parasitismo sistêmico e/ou tissular.

3 ABORDAGEM EXPERIMENTAL

A abordagem experimental do projeto é o estudo da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos quiméricos (quimeras de medula óssea), que contenham leucócitos funcionalmente normais e células estruturais (qualquer célula não leucocitária) deficientes no receptor para IFN γ .

A nossa hipótese de trabalho é que caso exista alguma atividade efetora frente ao *T. cruzi* mediada pelo IFN γ sobre as células não leucocitárias, o animal quimérico WT/KO infectado deve ter um número maior de ninhos no coração, músculo esquelético e fígado que o animal quimérico controle WT/WT. Além disso, na eventualidade do IFN γ induzir nas células não leucocitárias a produção secundária de quimiocinas e/ou outros mediadores quimiotáticos, devemos esperar que o camundongo quimérico WT/KO infectado apresente uma infiltração leucocitária menor no coração, músculo e fígado do que o animal quimérico WT/WT.

Nas nossas experiências iremos utilizar duas cepas distintas de *T. cruzi*, a cepa Sylvio X10/4 e a cepa Y, que no camundongo imunocompetente induzem infecções de curso muito diferente. Assim, a cepa Y é altamente virulenta e resulta em altas parasitemias na fase aguda da infecção, enquanto que a cepa Sylvio X10/4 é pouco virulenta e determina uma infecção sem parasitemia patente.

Em relação à linhagem de camundongo, temos no Biotério de Isogênicos do ICB duas linhagens IFN γ R-KO, uma em “background” C57BL/6 e a outra em “background” 129Sv. Optamos pela utilização de animais IFN γ R-KO em “background” C57BL/6 que permitem uma maior resistência ao *T. cruzi*, com maior tempo de sobrevida.

4 DETALHAMENTO EXPERIMENTAL

Foram obtidas quimeras de medula óssea utilizando camundongos deficientes em IFN γ R, irradiados e reconstituídos com medula óssea de camundongos selvagens (“wild-type” WT). Oito semanas após a transferência, estabeleceu-se o estado quimérico, no qual parte dos leucócitos expressa IFN γ R, mas as células não leucocitárias continuam deficientes neste receptor. Como controle, foram estabelecidas quimeras controle (animais WT irradiados e reconstituídos com medula WT, nos quais tanto os leucócitos como as células estruturais expressam receptores para IFN γ).

Depois de confirmado o estado quimérico nas quimeras experimentais, os animais quiméricos e os controles normais e deficientes foram infectados pelo *T. cruzi*, procedendo-se ao estudo do curso da infecção (carga parasitária e infiltração leucocitária) no coração, músculo esquelético, e fígado.

4.1 Obtenção das quimeras e relação de quimeras pretendidas

Para a obtenção das quimeras os animais receptores foram irradiados com dose letal (para criar espaço) e reconstituídos com células totais da medula óssea do animal doador. Desta forma obtemos animais nos quais:

- as células não profissionais do sistema imune (o que do ponto de vista dos imunologistas constituem o arcabouço do animal) que inclui fibroblastos, células musculares, células do endotélio vascular, adipócitos, hepatócitos, entre outras, são derivadas do receptor irradiado;
- enquanto que os leucócitos são total ou parcialmente derivados das células de medula transplantada, ou seja, do doador.

Assim, dois tipos de quimeras tiveram que ser construídas:

- 1) quimera controle: WT-WT, construída com animais C57BL/6 irradiados e reconstituídos com medula óssea de animais C57BL/6;
- 2) quimera WT-IFN γ RKO (WT/KO), construída com animais IFN γ R-KO em “background” C57BL/6 irradiados e reconstituídos com medula óssea de animais C57BL/6.

Avaliando o curso da infecção nas quimeras WT/KO em relação às quimeras WT-WT e á camundongos IFN γ R-KO (KO) e WT (C57BL/6), como controles, verificaremos se alguma atividade sinalizadora ou efetora frente ao *T. cruzi* é induzida pelo IFN γ nas células não leucocitárias.

4.2 Avaliação do estado quimérico

No caso de quimeras realizadas em animais IFN γ R-KO inoculados com medula de camundongo C57BL/6, a reconstituição foi avaliada estimando em uma pequena alíquota de sangue periférico, através de citometria de fluxo, a percentagem de células T (CD3⁺) e B (B220⁺) que expressam IFN γ R.

4.3 Estudos pretendidos nas quimeras

Camundongos quiméricos WT/KO e controles são infectados pelo *T. cruzi* e estudados em relação a:

- evolução geral da infecção: carga parasitária e mortalidade;
- estudo histopatológico cardíaco, prestando-se especial atenção ao nível local de parasitismo (número de ninhos) e à intensidade do infiltrado inflamatório;
- estes mesmos estudos são realizados no fígado e músculo esquelético dos animais infectados.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Camundongos isogênicos machos ou fêmeas das linhagens C57BL/6 e IFN γ R-KO em “background” C57BL/6, foram utilizados ao atingirem 10 semanas de idade. Esses animais foram criados no Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, (ICB- II e IV) com água e ração autoclavadas e mantidos em estantes para animais em experimentação.

5.2 Preparação das quimeras

A preparação das quimeras foi realizada em três etapas: coleta das células da medula óssea, irradiação e reconstituição. Todos os camundongos foram tratados um dia antes de serem irradiados e até quatro semanas após a irradiação com solução de ciprofloxacina CIPRONIL (Farmabase Saúde Animal Ltda., Brasil) nos bebedouros na concentração de 1 mg/ml de água autoclavada.

5.2.1 Coleta de células da medula óssea

Foram coletadas células totais da medula óssea de fêmur e tíbia de camundongos C57BL/6 (WT) sacrificados por narcose em CO₂ e manipulados em condições estéreis. A pele foi aberta com material estéril, defletindo esta até chegar ao fêmur e à tíbia, dissecando os tecidos do lado de fora dos ossos e colocando estes em RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 1% S.F.B. Depois, os extremos dos ossos foram cortados e enxugados, passando 3 ml de RPMI 1640 - S.F.B. 3% até o osso ficar branco, e coletando as células em tubo de polipropileno.

Após coletada a medula, foram retirados os grumos precipitados e o sobrenadante centrifugado a 1200 rpm por 8 minutos. Depois, as células foram ressuspensas em RPMI 1640 - 1% S.F.B., para realizar a contagem celular na câmara de Neubauer e estimar a percentagem de células vivas.

5.2.2 Irradiação

Os camundongos das linhagens IFN γ R-KO e C57BL/6 (WT) foram anestesiados com Xylazina (RompumTM; 0,25 mg/animal) e cloridrato de ketamina (KetaminaTM; 1,25 mg/animal), e seguidamente irradiados com 1200 rads (DAY et al., 2006), usando um irradiador biológico de fonte selada de Césio (Empresa Internacional CIS, subsidiária da Companhia ORIS Indústria S.A.) que está situado no Departamento de Imunologia do ICB, ou um irradiador com fonte de cobalto (CO-60 panorâmica), situado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

5.2.3 Reconstituição

Os animais irradiados foram reconstituídos seguidamente, pela via intraperitoneal (i.p.), com 24-30 X10⁶ células da medula óssea de camundongos C57BL/6, ressuspendidas em 300 μ l de RPMI 1640 sem S.F.B.

5.2.3.1 Avaliação do grau de Reconstituição

Para avaliar o grau de reconstituição das quimeras foi realizada uma análise através de citometria de fluxo nos leucócitos do sangue periférico, 8 semanas após a inoculação das células da medula óssea. Trinta microlitros de sangue periférico obtido pela cauda de cada camundongo foram misturados com 100 μ l de PBS 1X/Heparina e 10 ml de RPMI 1640 (Gibco) e centrifugados à 300 g por 10 minutos. As hemácias foram lisadas com tampão de lise pH 7,4 (0,5125 g de TRIS base e 2,14 g de NH₄CL) na proporção volume/volume 1:9 durante 4 minutos e no gelo. A lise foi bloqueada usando RPMI 1640 - 3% de S.F.B. Após centrifugação a 300 g por 10 minutos, o pellet foi ressuspendido em tampão de FACS e as células novamente centrifugadas a 300g por 10 minutos.

As suspensões celulares foram marcadas com anticorpos anti-CD3 – FITC, - CD45R (B220) – Cy e -IFN γ R – biotina, incubando por 30 minutos a 25 °C. Numa segunda etapa e após 3 lavados, as células foram incubadas com estreptoavidina –

PE. Após novo ciclo de lavados, as células foram analisadas usando o citômetro FACS calibur (Becton and Dickinson., San José, C.A., USA).

5.3 Infecção com *T. cruzi*

A infecção dos animais com os parasitas das cepas de Sylvio X10/4 ou Y foi realizada após confirmar a reconstituição. Na primeira, terceira e quarta experiências utilizamos parasitas da cepa Sylvio X10/4 provenientes de culturas de células LLCMK2. Os parasitas provenientes da cultura foram colocados em tubo de polipropileno de 50 mL e centrifugados a 3000 rpm, por 5 minutos, a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em meio RPMI 1640. O sedimento ressuspendido permaneceu no gelo enquanto os parasitos foram contados em câmara de Neubauer. O número de parasitas *T. cruzi* Sylvio X10/4 inoculado foi 1×10^5 parasitas por animal, que foram administrados pela via i.p. na primeira experiência e pela via endovenosa (plexo oftálmico) na terceira e quarta experiências.

Na segunda experiência, os animais foram infectados i.p. com 1000 tripomastigotas sanguícolas da cepa Y, mantida através de repique semanal em camundongos A/J. Neste caso, uma alíquota de sangue de animal infectado foi examinada em câmara de Neubauer e ajustada para conter 1000 tripomastigotas em 0,2 ml de PBS.

Em todos os casos, após a infecção e pelo resto da experiência, os animais foram tratados com solução de CIPRONIL na água de beber.

5.4 Avaliação de parasitemias, carga parasitária local e análise histopatológica

As parasitemias dos camundongos infectados com 1×10^5 tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* clone Sylvio X10/4 ou 1×10^3 tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa Y foram realizadas a partir do sétimo dia de infecção, a partir de 5 μ l do sangue da cauda, colocados em lâmina, contando 50 campos microscópicos em objetiva de 40X.

Os animais foram anestesiados e sangrados até a morte através de punção cardíaca e os órgãos coletados, fixados por 24h em solução de formaldeído a 10%, e posteriormente, em álcool 70% por 24h. Os órgãos fixados foram inclusos em blocos de parafina. O coração foi dividido sagitalmente em duas partes, cada uma contendo as quatro cavidades. Quatro cortes sagitais de 5 μ m, não consecutivos, foram obtidos do coração, assim como do fígado e músculo estriado esquelético (quadríceps) e corados com hematoxilina-eosina. Seções de cada tecido foram analisadas na sua totalidade através de microscopia óptica, usando o microscópio Olympus (Olympus Optical Co., Tokyo., Japan). A carga parasitária local nos diferentes órgãos foi avaliada através da contagem do número de ninhos nas preparações histológicas coradas com hematoxilina-eosina. Os resultados são expressos para cada órgão de cada animal pela média do número de ninhos nos diferentes cortes histológicos. Para registrar os infiltrados inflamatórios, um dos elementos centrais da análise histopatológica, consideramos que para ser um foco inflamatório devia conter 10 ou mais leucócitos por campo microscópico observado na objetiva de 40X (TALVANI e RIBEIRO, 2000), de acordo com a seguinte escala de valores:

- (0) nenhum infiltrado em 50 campos microscópicos (objetiva de 40x);
- (1) de 1 - 10 infiltrados em 50 campos microscópicos (objetiva de 40x);
- (2) de 11 - 20 infiltrados em 50 campos microscópicos (objetiva de 40x);
- (3) de 21 - 30 infiltrados em 50 campos microscópicos (objetiva de 40x);
- (4) mais de 31 infiltrados em 50 campos microscópicos (objetiva de 40x).

5.5 Análise Estatística

Os resultados são expressos pela média +/- desvio padrão de cada grupo. A análise estatística (realizada no programa InStat – GraphPad Software) foi avaliada por ANOVA utilizando o método de Tukey para comparações múltiplas. A comparação de parasitemias entre o grupo WT/WT e WT/KO foi realizada a cada dia de infecção através do T de Student. Foi considerada significância estatística se $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

Mostraremos o resultado de quatro experiências. Os resultados de cada uma delas são apresentados em separado, divididas em duas partes: 1) Avaliação do estado quimérico após reconstituição, e 2) Avaliação da infecção pelo *T. cruzi*.

6.1 1ª EXPERIÊNCIA: Avaliação do estado quimérico

Inicialmente, construímos quimeras WT/WT e WT/KO, conforme descrito no capítulo de materiais e métodos.

Quatro grupos de animais foram estabelecidos:

- controles positivos: 5 animais C57BL/6 (WT);
- controles negativos: 5 animais IFN γ R-KO em “background” C57BL/6 (KO);
- quimeras WT/WT (WT/WT): 8 animais C57BL/6 irradiados com 1200 rads e reconstituídos via i.p. com 34×10^6 células da medula óssea obtidas de camundongos C57BL/6, em 300 μ l de RPMI 1640 sem S.F.B;
- quimeras WT/IFN γ R-KO (WT/KO): 9 animais IFN γ R-KO irradiados com 1200 rads e reconstituídos via i.p. com 34×10^6 de células da medula óssea obtida de camundongos C57BL/6, em 300 μ l de RPMI 1640 sem S.F.B.

Com o objetivo de avaliar a eficiência da reconstituição nos animais WT/KO, às oito semanas após a irradiação/reconstituição, foi realizado o teste de avaliação do estado quimérico, descrito no capítulo de materiais e métodos.

Espera-se nestes animais que uma fração elevada das populações celulares CD3⁺ e B220⁺ expresse IFN γ R. Já os animais dos grupos WT e WT/WT deverão expressar o receptor para IFN γ na totalidade ou maior parte das células B220⁺ e CD3⁺, enquanto que nos animais do grupo KO, o esperado é que a fração positiva seja mínima.

Figura 1. Análise da frequência de células IFN γ R⁺ nas populações de células CD3⁺ e B220⁺ nos camundongos da 1^a experiência. Oito semanas após a transferência de medula óssea foi analisada a frequência de células IFN γ R⁺ nas populações de células CD3⁺ e B220⁺ do sangue periférico, em animais quiméricos e controles (1^a experiência).

Nos animais do grupo KO encontramos baixa frequência de células IFN γ R nas populações CD3⁺ e B220⁺. Este grupo mostrou diferença estatística para as duas populações celulares se comparado ao grupo WT/KO ($p < 0,001$). Nos animais do grupo WT/WT a expressão de IFN γ R foi por volta de 95% nas duas populações, e não houve diferença estatística com o grupo WT, mas sim frente ao grupo WT/KO ($p < 0,001$) (Figura 1).

Nas quimeras experimentais WT/KO, a frequência de células do sangue periférico que expressam IFN γ R mostrou uma grande variação entre os diferentes animais. De fato, 33.3% (3 de 9 animais) do grupo de quimeras experimentais não mostraram nenhum grau de reconstituição, já que a fração de células IFN γ -positivas foi menor que 5%. O 66% do grupo WT/KO (6 dos 9 animais), entretanto, mostrou uma reconstituição acima de 40%, mas pouco homogênea. A percentagem de expressão de receptor para IFN γ nestes animais oscilou entre 40-72% das células T (CD3⁺) e 47-83% das células B (B220⁺). Deste modo, vemos que 4 de 6

animais expressam frequência de células IFN γ R acima de 62% e abaixo de 72% nas células CD3⁺ e expressão maior de 65% e menor de 83% nas células B220⁺.

Interessantemente, na totalidade dos animais dos grupos KO e quimera experimental WT/KO observamos que a expressão de IFN γ R nas células B220⁺ foi discretamente maior do que nas células CD3⁺.

Figura 2. Percentagem de reconstituição de células CD3⁺ IFN γ R⁺ e B220⁺ IFN γ R⁺ da 1ª experiência. Oito semanas após a transferência de medula óssea, foi analisada a percentagem de reconstituição, no sangue de animais quiméricos e controles (1ª experiência). A. Expressão de IFN γ R em células CD3⁺. B. Expressão de IFN γ R em células B220⁺.

Desconsiderando os três animais WT/KO não reconstituídos, as medias de reconstituição de células IFN γ R⁺ nas populações CD3⁺ e B220⁺ do sangue, foram respectivamente de 59% e 66% (Figura 2).

Depois de confirmado o estado quimérico nos animais WT/KO, foi realizada a infecção com tripomastigotas de cultura da cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi*. Os 3 animais não reconstituídos do grupo quimera experimental WT/KO foram infectados, mas foram excluídos das análises posteriores.

6.2 1ª EXPERIÊNCIA: Avaliação da infecção pelo *T. cruzi*

Nesta seção mostraremos o curso da infecção (carga parasitária e infiltração leucocitária no coração, fígado e músculo esquelético) dos animais quiméricos e controles da 1ª experiência, após infecção. Os 27 camundongos foram infectados via i.p. com 100.000 formas de *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4, em um volume de 300 µl de RPMI 1640 sem S.F.B. Para evitar infecções secundárias devidas à manipulação, os animais foram tratados com antibiótico por toda a experiência, começando um dia antes da infecção.

Uma vez infectados, os camundongos dos diferentes grupos experimentais foram estudados em relação a:

- evolução geral da infecção: carga parasitária e mortalidade;
- estudo histológico cardíaco, prestando-se especial atenção ao nível local de parasitismo (número de ninhos) e à intensidade do infiltrado inflamatório;
- estes mesmos estudos foram realizados no músculo esquelético e fígado.

Figura 3. Análise comparativa da carga parasitária sistêmica (sangue) em camundongos controle positivo (WT), controle negativo (IFN γ R-KO), quimera WT/WT e quimera WT/KO da 1ª experiência. Os animais foram infectados com 10^5 tripomastigotas da cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi* e as parasitemias analisadas em diferentes dias da infecção. Os números na figura indicam o número de animais positivos no total de animais do grupo.

No dia 10 pós infecção (p.i.), a parasitemia tornou-se positiva em 1 dos 5 animais do grupo controle negativo (KO), em outros 2 animais no dia 12 p.i. e, em mais um, no dia 13 p.i. Contudo, é notável que 2 animais permaneciam negativos no dia 13 p.i. A precipitada positividade do grupo KO era de se esperar já que esta linhagem é muito susceptível ao *T. cruzi* pela sua condição de deficiente do receptor para IFN γ . Em relação à mortalidade um dos animais morreu espontaneamente no dia 11-12 p.i., e, em função do mal estado apresentado, o restante do grupo KO foi sacrificado nos dias 12 (01 animal) e 13 (03 animais). A necessidade de coletar os órgãos em ótimas condições para realizar a análise histopatológica não permite esperar a morte espontânea dos animais, razão pela que é impossível estudarmos curvas de mortalidade.

No grupo WT/KO, a parasitemia positivou no dia 15 p.i. em 33% (2 de 6 animais) do grupo. No entanto, 66% (4 de 6 animais) do grupo WT/KO nunca

mostraram parasitemias positivas. Para realizarmos a análise histopatológica, os animais de grupo WT/KO foram sacrificados no dia 13 (02 animais) e dia 16 (04 animais). Nenhum animal morreu espontaneamente.

Diferentemente dos grupos KO e WT/KO, nos animais dos grupos WT (05 animais) e WT/WT (08 animais) a parasitemia nunca positivou até o dia 16 p.i. Dois animais WT e dois WT/WT foram sacrificados no dia 13 p.i., e o restante dos animais no dia 16 p.i. Estes resultados são esperados, uma vez a cepa Sylvio X10/4 não determina parasitemia patente nos camundongos C57BL/6.

Os dados individuais de parasitemia podem ser observados na Tabela 1. De interesse não observamos correlação inversa entre o nível de reconstituição das quimeras WT/KO e a parasitemia. Assim, e como exemplo, os dois animais que tiveram maior reconstituição por células IFN γ R⁺ foram aqueles com parasitemia mais elevada.

Em relação ao parasitismo cardíaco, registrado pela contagem do número total de ninhos de amastigotas em 50 campos microscópicos no objetivo de 40x, observamos que os ninhos estavam praticamente ausentes no dia 13 p.i., mas foram revelados em forma clara no dia 16 p.i. (Figura 4). Entretanto, não houve diferenças estatísticas entre os grupos WT/WT e WT/KO, apesar de que 1 animal do grupo WT/KO exibiu um número elevado de ninhos no dia 16 de infecção. As médias de ninhos no coração no dia 16 p.i. foram 4,5, 2,8 e 11,7 ninhos/corte histológico, respectivamente para os grupos WT, WT/WT e WT/KO.

Tabela 1. Resultados da 1ª experiência. Quimeras em fundo C57BL/6. Infecção com T. cruzi da cepa Sylvio X10/4.

Grupos		Análise do quimerismo		PARASITEMIA										Dia do sacrifício	Peso Baço mg	Patologia					
				dias												coração		Fígado		Músculo estriado	
				10	11	12	13	14	15	16	infiltrado	ninhos	infiltrado			ninhos	infiltrado	ninhos	infiltrado	ninhos	
KO		% CD3 IFNgR+	%B220 IFNgR+	2	6							11/12	150	0	0	1	0	0	0		
KO				0	0	77						12	170	0	0	3	6	0	0		
KO				0	0	0	49					13	140	1	0	2	3	0	0		
KO				0	0	0	0					13	70	0	0	1	0	0	0		
KO				0	0	0	0					13	40	1	0	0	0	0	0		
WT				0	0	0	0					13	210	1	0	3	0	1	0		
WT				0	0	0	0					13	170	3	0	3	0	1	0		
WTWT				0	0	0	0					13	110	2	1	2	0	1	0		
WTWT				0	0	0	0					13	160	1	0	1	0	0	0		
WTIKO	45.8	83.1		0	0	0	0					13	60	1	0	0	0	0	0		
WTIKO	40.6	65.6		0	0	0	0					13	120	1	2	3	2	0	0		
WT				0	0	0	0	0	0	0	0	16	240	1	0	2	0	1	0		
WT				0	0	0	0	0	0	0	0	16	200	2	2	2	0	1	0		
WT				0	0	0	0	0	0	0	0	16	250	3	7	1	0	1	1		
WTWT				0	0	0	0	0	0	0	0	16	200	2	5	2	0	2	1		
WTWT				0	0	0	0	0	0	0	0	16	240	2	0	2	0	3	0		
WTWT				0	0	0	0	0	0	0	0	16	190	0	0	2	0	3	0		
WTWT				0	0	0	0	0	0	0	0	16	300	3	7	2	0	2	0		
WTWT				0	0	0	0	0	0	0	0	16	210	2	1	2	0	4	3		
WTWT				0	0	0	0	0	0	0	0	16	160	3	4	2	0	3	3		
WTIKO	71.7	65.7		0	0	0	0	4	60			16	230	3	37	2	11	2	7		
WTIKO	65.6	47.9		0	0	0	0	0	0	0	0	16	130	2	0	2	1	0	0		
WTIKO	63.9	59.0		0	0	0	0	0	0	0	0	16	110	1	0	2	0	0	0		
WTIKO	63.7	74.0		0	0	0	0	3	6			16	150	3	10	2	1	1	0

Figura 4. Análise comparativa do número de ninhos presentes no tecido cardíaco nos animais do grupo controle KO, grupo controle WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 1ª experiência. Os animais foram sacrificados nos dias 12, 13 e 16 da infecção com 10^5 tripomastigotas de cultura da cepa Sylvio X10/4.

Ao correlacionarmos em cada animal a carga parasitária cardíaca com o número de parasitas no sangue (Tabela 1), observamos que os dois animais WT/KO com maior parasitemia no dia 16 p.i. são aqueles com maior número de ninhos no coração. No entanto, na mesma data alguns dos animais WT e WT/WT também mostram ninhos no coração, mas não apresentam tripomastigotas no sangue. Mais ainda, nos dias 12-13 p.i. há animais controle KO que apresentam altas parasitemias e não apresentam ninhos no coração.

Figura 5. Análise comparativa do infiltrado cardíaco nos animais do grupo controle KO, grupo controle WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 1ª experiência. Os animais foram sacrificados nos dias 12, 13 e 16 de infecção com 10^5 tripomastigotas de cultura da cepa Sylvio X10/4. Intensidade do infiltrado: (0) nenhum infiltrado, (1) 1 - 10 infiltrados, (2) 11 - 20 infiltrados, (3) 21 - 30 infiltrados e (4) mais de 31 infiltrados.

No dia 12 p.i., os animais do grupo KO mostraram, como máximo, grau 1 de infiltração leucocitária no coração (média 0,66), ou seja, um nível muito discreto. Nos animais do grupo WT/KO, os infiltrados no coração foram discretos no dia 13 p.i. (média 1) e moderados no dia 16 p.i. (média 2), mas não observamos diferenças estatísticas em relação aos animais do grupo WT/WT (média 2,25) (Figura 5).

Em relação ao parasitismo no fígado, observamos que alguns animais do grupo KO apresentam ninhos nos dias 12 e 13 p.i., ou seja, em uma data na qual não são

detectados no coração. Por outro lado, existe uma tendência ($p=0,075$) dos animais do grupo WT/KO a exibirem um número maior de ninhos no dia 16 de infecção do que nos animais do grupo WT/WT (Figura 6). Nesta data, 3 dos 4 animais WT/KO apresentam ninhos no fígado (média de 3,25 ninhos/animal), enquanto que nos 6 animais WT/WT a procura de ninhos deu resultado negativo.

Em relação à infiltração leucocitária no fígado, observamos que alguns dos animais KO mostraram nível 2 ou 3 de infiltração leucocitária nos dias 12-13 de infecção (Figura 7), superior ao encontrado no coração (comparar as Figuras 5 e 7). Por outro lado, os animais do grupo WT/KO mostraram grau moderado de infiltração leucocitária nos dias 13 (média 1,5) e 16 p.i. (média 2), similar à dos animais do grupo WT/WT.

Figura 6. Análise comparativa do número de ninhos presentes no fígado dos animais do grupo controle KO, grupo controle WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 1ª experiência. Os animais foram sacrificados nos dias 12, 13 e 16 da infecção com 10^5 tripomastigotas de cultura da cepa Sylvio X10/4.

Figura 7. Análise comparativa da intensidade de hepatite nos animais do grupo controle KO, grupo controle WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 1ª experiência. Os animais foram sacrificados nos dias 12, 13 e 16 da infecção com 10^5 tripomastigotas de cultura da cepa Sylvio X10/4. Intensidade do infiltrado: (0) nenhum infiltrado, (1) 1 - 10 infiltrados, (2) 11 - 20 infiltrados, (3) 21 - 30 infiltrados e (4) mais de 31 infiltrados.

Já em relação à presença de ninhos na musculatura estriada (quadríceps), estes não foram detectados no dia 13 p.i.. No entanto, no dia 16 p.i., eles puderam ser visualizados nos animais WT/KO e WT/WT, sem diferenças estatísticas entre estes dois grupos (Figura 8). As médias de ninhos/corte histológico nos grupos WT/WT e WT/KO foram de 1,16 e 1,75, respectivamente.

Não foram detectadas grandes diferenças no grau de infiltração leucocitária no músculo estriado (miosite) dos diferentes grupos, exceto no dia 16 p.i., quando se

observa que o infiltrado celular é significativamente mais intenso nos animais WT/WT do que nos animais WT/KO ($p < 0,01$) (Figura 9).

Figura 8. Análise comparativa do número de ninhos presentes no músculo estriado esquelético nos animais do grupo controle KO, grupo controle WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 1ª experiência. Os animais foram sacrificados nos dias 12, 13 e 16 de infecção com 10^5 tripomastigotas de cultura da cepa Sylvio X10/4.

Figura 9. Análise comparativa do infiltrado inflamatório no músculo estriado esquelético nos animais do grupo controle KO, grupo controle WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 1ª experiência. Os animais foram sacrificados nos dias 12, 13 e 16 de infecção com 10^5 tripomastigotas de cultura da cepa Sylvio X10/4. Intensidade do infiltrado: (0) nenhum infiltrado, (1) 1 á 10 infiltrados, (2) 11 á 20 infiltrados, (3) 21 á 30 infiltrados e (4) mais de 31 infiltrados.

A tentativa de acharmos nos animais WT/KO uma correlação entre o grau de reconstituição e a patologia nos diferentes órgãos não revelou nenhuma associação de interesse. Assim, em forma análoga ao descrito quando da análise individual das parasitemias, o grau de reconstituição individual dos animais WT/KO não mostrou correlação inversa com o parasitismo tissular.

6.3 2ª EXPERIÊNCIA: Avaliação do estado quimérico

Interessados em avaliar o modelo de quimeras de medula óssea (**WT/IFN γ R-KO**), decidimos fazer outra experiência mudando alguns aspectos na tentativa de melhorar o modelo e cumprir os nossos objetivos.

Na segunda experiência decidimos mudar a cepa do *T. cruzi* com o objetivo de observar em forma mais clara diferenças nas parasitemias, na intensidade dos infiltrados inflamatórios e número de ninhos dos órgãos em estudo, nos diferentes grupos.

Assim, os animais WT/KO, WT/WT, C57BL/6 e IFN γ R-KO em “background” C57BL/6 foram infectados com 10^3 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*.

Quatro grupos foram estabelecidos:

- controles positivos: 9 animais C57BL/6 (WT);
- controles negativos: 4 animais IFN γ R-KO em “background” C57BL/6 (KO);
- quimeras WT/WT: 17 animais C57BL/6, irradiados com 1200 rads e reconstituídos via i.p. com 24×10^6 células da medula óssea obtidas de camundongos C57BL/6, em 300 μ l de RPMI 1640 sem S.F.B.;
- quimeras WT/IFN γ R-KO (WT/KO): 14 animais IFN γ R-KO, irradiados com 1200 rads e reconstituídos via i.p. com 24×10^6 células da medula óssea obtidas de camundongos C57BL/6, em 300 μ l de RPMI 1640 sem S.F.B.

Figura 10. Análise da freqüência de células IFN γ R⁺ nas populações de células CD3⁺ e B220⁺ nos camundongos da 2^a experiência. Oito semanas após a transferência de medula óssea foi analisada a freqüência de células IFN γ R⁺ nas populações de células CD3⁺ e B220⁺ do sangue periférico, em animais quiméricos e controles da 2^a experiência.

Oito semanas após a irradiação/reconstituição fomos avaliar a eficiência da reconstituição dos grupos de quimeras WT/WT e WT/KO. O grupo controle negativo KO mostrou baixa freqüência de células CD3⁺ IFN γ R⁺ e células B220⁺ IFN γ R⁺ (Figura 10), assim como o grupo WT e grupo quimera WT/WT mostraram alta expressão do IFN γ R⁺ para as duas populações. De outro lado, o grupo quimera WT/KO (14 animais) mostrou células CD3⁺ IFN γ R⁺ com uma freqüência que oscilou entre 62% e 2.75% e para a população de B220⁺ IFN γ R⁺ a freqüência oscilou entre 69% e 1.49%. Em função da grande diferença entre as percentagens de reconstituição dos animais, decidimos excluir aqueles com reconstituição mais baixa. Conseqüência deste fato e da morte de alguns animais dias após, o grupo experimental WT/KO ficou reduzido a 4 camundongos. De outro lado, o grupo WT/WT, originalmente constituído por 17 animais, foi reduzido para 6 animais.

Figura 11. Segunda avaliação da frequência de células IFN γ R⁺ nas populações de células CD3⁺ e B220⁺ nos camundongos da 2^a experiência. Onze semanas após a transferência de medula óssea foi analisada a frequência de células IFN γ R⁺ nas populações de células CD3⁺ e B220⁺ do sangue periférico, em animais quiméricos e controles para confirmação do estado quimérico.

Na semana onze após a irradiação/reconstituição realizamos uma segunda avaliação para confirmar o estado quimérico do grupo de quimeras experimentais com que iríamos trabalhar (Figura 11). Os resultados mostram que a média da frequência de células CD3⁺ e B220⁺ que expressam IFN γ R nos animais do grupo quimera WT/KO foi de 44% para a população de CD3⁺ e de 54% para a população B220⁺. No entanto, 1 de 4 animais mostrou uma reconstituição baixa, 18% para as células CD3⁺ e de 27% para a população B220⁺. O resto do grupo mostrou uma reconstituição acima de 44% para as células CD3⁺ e de 46% para a população B220⁺. Como esperado, os animais dos grupos WT e WT/WT tiveram expressão de IFN γ R acima de 90% e os do grupo KO mostraram uma frequência baixa para este receptor. Diferenças estatísticas entre os grupos WT/WT e WT/KO foram observadas ($p < 0,001$).

Nesta experiência, chama de novo a atenção que a expressão de IFN γ R nas células B220⁺ é discretamente maior do que nas células CD3⁺ (Figuras 11 e 12).

Pelo fato de não observarmos um comportamento diferente após infecção (em relação à parasitemia e patologia nos órgãos) no animal WT/KO com menor percentagem de reconstituição (ver mais adiante na Tabela 2), decidimos não excluí-lo e estudá-lo junto com os demais animais do seu grupo.

Figura 12. Percentagem de reconstituição de células CD3⁺ IFN γ R⁺ e B220⁺ IFN γ R⁺ da 2ª experiência. Onze semanas após a transferência de medula óssea, foi analisada a reconstituição leucocitária no sangue de animais quiméricos e controles (2ª experiência). A. Expressão de IFN γ R em células CD3⁺. B. Expressão de IFN γ R em células B220⁺.

Após de conferir o estado de reconstituição, os animais WT/KO, WT/WT, C57BL/6 e IFN γ R-KO em “background” C57BL/6 foram infectados com 10^3 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, e tratados com antibiótico por toda a experiência, começando um dia antes da infecção.

6.4 2ª EXPERIÊNCIA: Avaliação da infecção pelo *T. cruzi*

No dia 7 p.i. todos os animais do grupo controle negativo KO tiveram níveis baixos de parasitemia (média: $5,5 \text{ parasitas} \times 10^{-4}/\text{ml}$) que foram aumentando até chegar a valores muito altos (média: $1680 \text{ parasitas} \times 10^{-4}/\text{ml}$), no dia 12 p.i., quando os animais começaram a ficar em mal estado e foi necessário sacrificá-los.

No grupo quimera WT/KO, todos os animais tiveram parasitemia positiva no dia 10 p.i. (média: 134 parasitas $\times 10^{-4}/\text{ml}$) que foi aumentando até o sacrifício no dia 13 p.i. (média: 290 parasitas $\times 10^{-4}/\text{ml}$), mas sempre em níveis inferiores aos dos animais do grupo controle negativo KO (Figura 13).

Figura 13. Análise comparativa da carga parasitaria sistêmica (sangue) nos grupos controle negativo (IFN γ R-KO), controle positivo (WT), quimera WT/WT e quimera WT/KO 2ª experiência. Os animais foram infectados com 10^3 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e as parasitemias analisadas em diferentes dias da infecção. Nos dias 12 e 13 p.i., WT/WT versus WT/KO $p < 0.0005$. Os números na figura indicam o número de animais positivos no total de animais do grupo.

No grupo controle WT, todos os animais positivaram no dia 10 p.i. Neste dia foi atingido o pico de parasitemia (média: 41 parasitas $\times 10^{-4}$) com sensível queda nos dias 12 e 13 p.i. (média no dia 13 p.i.: 8,8 parasitas $\times 10^{-4}/\text{ml}$)

No grupo WT/WT, todos os animais positivaram no dia 10 p.i., e, em forma análoga ao grupo controle WT, o pico de parasitemia foi atingido neste dia (média: 190 parasitas $\times 10^{-4}/\text{ml}$), com sensível queda nos dias sub-seguintes (média no dia 13 p.i.: 19 parasitas $\times 10^{-4}/\text{ml}$).

Diferentemente destes dois grupos, no grupo quimera WT/KO as parasitemias continuaram crescendo após o dia 10, atingindo valores elevados (média no dia 13 p.i.: 291 parasitas $\times 10^{-4}/\text{ml}$), porém inferiores aos exibidos pelo grupo KO no dia 12 p.i. Para os dias 12 e 13 p.i., houve diferença estatística entre os grupos WT/WT e WT/KO ($p < 0,0005$).

Os dados individuais de parasitemia podem ser observados na Tabela 2. Da mesma forma que na 1ª experiência, não observamos correlação inversa entre o nível de reconstituição das quimeras WT/KO e a parasitemia. Assim, as curvas de parasitemia exibidas pelos animais que tiveram 17% e 62% de células $\text{IFN}\gamma\text{R}^+$ na população CD3^+ não foram muito diferentes. No entanto, o animal com 17% de reconstituição nas células T foi o único animal WT/KO que positivou no dia 7 p.i. Neste experimento nenhum animal morreu espontaneamente.

Tabela 2. Resultados da 2ª experiência. Quimeras em fundo C57BL/6. Infecção com T. cruzi da cepa Y.

Grupos	Análise do quimerismo			PARASITEMIA				Dia do Sacrifício	Peso baço	Patologia						
				dias						coração		fígado		músculo estriado		
	% CD3 IFNgR+	%B220 IFNgR +		7	10	12	13			infiltrado	ninhos	infiltrado	ninhos	infiltrado	ninhos	
KO				10	278	2400		12	140	1	11	3	27	0	0	
KO				1	188	1800		12	120	0	4	2	49	0	0	
KO				4	390	1490		12	120	1	12	3	47	0	0	
KO				7	220	1030		12	90	1	5	2	49	0	0	
WT				0	61	5	7	13	360	2	2	3	3	1	0	
WT				0	41	11	10	13	420	2	3	2	1	0	0	
WT				0	28	10	10	13	300	3	2	2	0	0	0	
WT				0	42	1	5	13	370	2	11	1	1	0	0	
WT				0	33	6	12	13	300	1	1	2	2	0	0	
WT/WT				0	190	14	19	13	130	2	6	2	2	0	0	
WT/WT				0	180	10	18	13	160	1	1	2	3	0	0	
WT/WT				0	230	12	20	13	150	2	2	3	2	0	0	
WT/WT				0	140	36	18	13	150	2	2	3	2	0	0	
WT/WT				0	201	2	29	13	260	2	1	2	2	0	0	
WT/WT				0	199	3	10	13	220	2	0	2	2	0	0	
WT/KO	62.5	75.5		0	206	250	305	13	210	1	18	1	14	0	0	
WT/KO	44.1	46.4		0	151	248	307	13	290	2	22	2	15	0	0	
WT/KO	17.6	26.8		2	89	318	400	13	210	1	6	2	1	0	0	
WT/KO	55.6	68.7		0	93	118	150	13	240	1	6	2	10	0	0

Figura 14. Análise comparativa do número de ninhos presentes no tecido cardíaco dos animais do grupo controle KO, grupo controle WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 2ª experiência. Os animais foram sacrificados nos dias 12 (KO) e 13 (outros grupos) de infecção com 10^3 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

Em relação ao parasitismo tissular (Figura 14), no dia 12 p.i. o grupo controle negativo KO mostrou a presença de ninhos no tecido cardíaco com uma média de 8 ninhos/animal. No dia 13 p.i. destaca-se os animais do grupo WT/KO que apresentavam um número maior de ninhos (média: 13 ninhos/animal) do que os animais dos grupos WT e WT/WT (média: 3,8 e 2 ninhos/animal, respectivamente), havendo diferença estatística entre os grupos WT/WT e WT/KO ($p<0,05$).

Nível de patologia cardíaca

Figura 15. Análise comparativa do infiltrado cardíaco nos animais do grupo controle negativo KO, grupo controle positivo WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 2ª experiência. Os animais foram sacrificados nos dias 12 (KO) e 13 (outros grupos) de infecção com 10^3 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Intensidade do infiltrado: (0) nenhum infiltrado, (1) 1 - 10 infiltrados, (2) 11 - 20 infiltrados, (3) 21 - 30 infiltrados e (4) mais de 31 infiltrados.

No dia 13 p.i., apesar dos infiltrados inflamatórios serem ainda discretos, observamos que estes são inferiores no grupo WT/KO se comparados ao dos grupos WT e WT/WT (Figura 15). A análise estatística revelou diferença entre os grupos WT/KO e WT/WT ($p < 0,05$).

Em relação ao número de ninhos no fígado (Figura 16), é importante destacar que o grupo controle negativo KO apresentou um número elevado de ninhos no dia 12 p.i. (média: 43 ninhos/animal). Por outro lado, no dia 13 p.i., o grupo quimera WT/KO apresentou um número maior de ninhos (média: 10 ninhos/animal) que os grupos controle positivo WT (média: 1,4 ninhos/animal) e quimera WT/WT (média: 2,2 ninhos/animal). Observa-se diferença estatística entre os animais dos grupos WT/WT e WT/KO com $p=0,007$.

Figura 16. Análise comparativa do número de ninhos presentes no fígado nos animais do grupo controle negativo KO, grupo controle positivo KO, grupo quimera WT/WT e WT/KO da 2ª experiência. Os animais foram sacrificados no dias 12 (KO) e 13 (outros grupos) de infecção com 10^3 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

Figura 17. Análise comparativa da intensidade de hepatite nos animais do grupo controle negativo KO, grupo controle positivo WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 2ª experiência. Os animais foram sacrificados nos dias 12 (KO) e 13 (outros grupos) de infecção com 10^3 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Intensidade do infiltrado: (0) nenhum infiltrado, (1) 1 - 10 infiltrados, (2) 11 - 20 infiltrados, (3) 21 - 30 infiltrados e (4) mais de 31 infiltrados. Não há diferenças estatísticas WT/WT vs WT/KO, mas há uma tendência com $p=0,057$.

Em relação à intensidade de hepatite no fígado (Figura 17), não observamos diferenças estatísticas entre os animais dos grupos WT/WT (média 2,33) e WT/KO (média 1,75), mas existe uma tendência dos animais WT/KO mostrarem níveis inferiores de hepatite ($p=0,057$).

Número de ninhinhos no músculo estriado

Figura 18. Análise comparativa do número de ninhinhos presentes no músculo estriado esquelético nos animais do grupo controle negativo KO, grupo controle positivo WT e grupos quimera WT/WT e WT/KO da 2ª experiência. Os animais foram sacrificados nos dias 12 (KO) e 13 (outros grupos) de infecção com 10^3 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Não há diferenças estatísticas WT/WT vs WT/KO.

As secções de tecido do músculo esquelético da 2ª experiência não revelaram ninhos *T. cruzi* em nenhum dos grupos (Figura 18).

Figura 19. Análise comparativa do infiltrado inflamatório no músculo estriado esquelético nos animais do grupo controle negativo KO, grupo controle WT, grupo quimera WT/WT e grupo quimera WT/KO 2ª experiência. Os animais foram sacrificados nos dias 12 (KO) e 13 (outros grupos) de infecção com 10^3 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Intensidade do infiltrado: (0) nenhum infiltrado, (1) 1 - 10 infiltrados, (2) 11 - 20 infiltrados, (3) 21 - 30 infiltrados e (4) mais de 31 infiltrados. Não há diferenças estatísticas WT/WT vs WT/KO.

Em concordância com a ausência de ninhos, a figura 19 mostra que praticamente não houve miosite nos animais da 2ª experiência, exceto em um animal do grupo controle positivo WT que apresentou miosite grau 1, o que é pouco relevante.

Analisando nos animais WT/KO a correlação individual entre a percentagem de reconstituição e o grau de patologia, observamos não existe uma correlação inversa entre a frequência de células $IFN\gamma R^+$ e a intensidade dos infiltrados, ou entre a frequência de células $IFN\gamma R^+$ e o número de ninhos, nos diferentes órgãos (Tabela 2).

6.5 3ª EXPERIÊNCIA: Avaliação do estado quimérico

Interessados em demonstrar a hipótese de trabalho e confirmar os dados obtidos nas duas experiências anteriores, decidimos avaliar o modelo de quimeras de medula óssea (**WT/IFN γ R-KO**) através de uma experiência com um número grande de quimeras WT/KO e WT/WT, usando camundongos C57BL/6 WT e IFN γ R-KO com “background” C57BL/6. Visto que o modelo experimental usado no segundo experimento (infecção pelo *T. cruzi* da cepa Y) resultou em altas parasitemias que poderiam influenciar o grau de invasão do coração dificultando a interpretação dos resultados decidimos retomar nesta nova experiência o modelo de infecção com parasitas da cepa Sylvio X10/4 usado no primeiro experimento.

Assim, foram infectados camundongos WT/KO, WT/WT, C57BL/6 e IFN γ R-KO em “background” C57BL/6 com 100.000 formas de *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4, via i.p. em um volume de 300 μ l de R.P.M.I. sem S.F.B. Com o interesse de impedir que infecções secundárias, agravadas pela manipulação, afetassem os animais, eles foram tratados com antibiótico por toda a experiência, começando um dia antes da infecção.

Os grupos de quimeras WT/WT e WT/KO, foram construídos conforme foi descrito no capítulo de materiais e métodos.

Os quatro grupos de animais foram estabelecidos assim:

- controles positivos: 3 animais C57BL/6 (WT);
- controles negativos: 5 animais IFN γ R-KO em “background” C57BL/6 (KO);
- quimeras WT/WT: 15 animais C57BL/6, irradiados com 1200 rads e reconstituídos via i.p. com 34×10^6 células da medula óssea obtidas de camundongos C57BL/6, em 300 μ l de RPMI 1640 sem S.F.B.;
- quimeras WT/IFN γ R-KO (WT/KO): 18 animais IFN γ R-KO, irradiados com 1200 rads e reconstituídos via i.p. com 34×10^6 células da medula óssea obtidas de camundongos C57BL/6, em 300 μ l de RPMI 1640 sem S.F.B.

Passadas 24 semanas após a irradiação/reconstituição foi realizado o teste de avaliação do estado quimérico, descrito anteriormente no capítulo de materiais e métodos.

A expectativa deste teste é que nos animais do grupo WT/KO, a maior parte das células $CD3^+$ e $B220^+$, expressem o receptor para $IFN\gamma$. Os animais dos grupos WT e WT/WT deverão expressar o $IFN\gamma R$ quase na totalidade das populações celulares $B220^+$ e $CD3^+$, e nos animais do grupo KO a expressão deste receptor deverá ser mínima ou nula.

Figura 20. Análise da frequência de células $IFN\gamma R^+$ nas populações de células $CD3^+$ e $B220^+$ nos camundongos da 3ª experiência. Vinte quatro semanas após a transferência de medula óssea foi analisada a frequência de células $IFN\gamma R^+$ nas populações de células $CD3^+$ e $B220^+$ do sangue periférico, de animais WT/WT, WT/KO, WT e KO (3ª experiência). *** $p < 0,001$.

Nos animais IFN γ -KO foi confirmada a baixa frequência de expressão do receptor de IFN γ nas populações de células CD3 $^{+}$ e B220 $^{+}$, os grupos WT e WT/WT mostraram uma alta expressão do IFN γ R $^{+}$ para as duas populações. Se comparado o grupo WT frente ao grupo de animais KO, encontramos uma diferença estatística altamente significativa com $p < 0,001$.

Nos animais do grupo WT/WT a expressão de IFN γ R ficou por volta de 95% nas duas populações (Figura 20), e não houve diferença estatística com o grupo WT.

Já o grupo WT/KO (18 animais) foi altamente heterogêneo em relação à frequência de IFN γ R com valores que oscilaram entre 73,9% e 3,5% para a população de células CD3 $^{+}$ e entre 76,7% e 1% para a população de células B220 $^{+}$. Ao se compararem os grupos WT/WT e WT/KO para as duas populações celulares (CD3 $^{+}$ e B220 $^{+}$), pode se observar diferença estatística ($p < 0,001$).

Em relação à reconstituição da população CD3 $^{+}$, no grupo WT/KO o 27,7% do grupo (5 de 18 animais) mostrou mínimo grau de reconstituição, já que a fração de células IFN γ -R positivas foi menor que 20%, contudo, o 72,2% do grupo (13 dos 18 animais), apresentou percentagens de reconstituição acima de 20%, porém, não homogênea. (Figura 20). No caso da reconstituição de células B220 $^{+}$, o 66% (12 de 18 animais) do grupo mostrou frequência de células IFN γ R $^{+}$ maior de 20%.

Neste experimento, não foi registrada uma expressão ligeiramente maior do receptor para IFN γ nas células B220 $^{+}$ do que nas células CD3 $^{+}$, como aconteceu nos dois experimentos anteriores.

Figura 21. Percentagem de reconstituição de células CD3⁺ IFN γ R⁺ e B220⁺ IFN γ R⁺ da 3ª experiência. Vinte quatro semanas após a transferência de medula óssea foi analisada a percentagem de reconstituição, no sangue de animais quiméricos e controles (3ª experiência). A. Expressão de IFN γ R em células CD3⁺. B. Expressão de IFN γ R em células B220⁺.

O 50% dos animais do grupo WT/KO mostra percentagens de reconstituição acima da média (36% e 30%) do grupo para as populações CD3⁺ e B220⁺, respectivamente (Figura 21).

Após a confirmação do estado quimérico do grupo WT/KO, os animais foram infectados com 10⁵ formas de tripomastigotas de cultura da cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi*.

6.6 3ª EXPERIÊNCIA: Avaliação da infecção pelo *T. cruzi*

Os camundongos deste experimento foram infectados com 100.000 formas de *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4, por via endovenosa (plexo oftálmico) em um volume de 300 μ l de RPMI 1640 sem S.F.B. Com a finalidade de evitar a morte precoce dos camundongos por infecções secundárias, começamos tratamento com antibiótico um dia antes da infecção e até o final do experimento.

Figura 22. Análise comparativa da carga parasitaria em camundongos dos grupos controle negativo (IFN γ R-KO), controle positivo (C57BL/6), quimera WT/WT e quimera WT/KO da 3ª experiência. Os animais foram infectados com 10^5 tripomastigotas da cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi* e as parasitemias analisadas em diferentes dias da infecção. Os números na figura indicam o número de animais positivos do total de animais do grupo. Existem diferenças estatísticas nos dias 25, 27, 29 e 31 p.i. entre WT/WT e WT/KO, $p < 0,05$.

No dia 20 p.i., 60% (3 de 5 camundongos) do grupo controle negativo KO positivaram, mostrando níveis baixos de parasitemia com média de $0,8 \text{ parasitas} \times 10^{-4}/\text{ml}$. No dia 23 p.i., todos os animais do grupo KO estavam positivos. Neste grupo os níveis de parasitemia foram aumentando até alcançar o pico no dia 25 p.i. com média: $8,2 \text{ parasitas} \times 10^{-4}/\text{ml}$ (Figura 22). No dia 27 p.i., o mal estado de um dos animais KO tornou necessário o sacrifício do grupo completo. Neste dia, as parasitemias dos animais KO diminuíram e em 1 de 5 animais ela se tornou negativa, em tal forma que a média de parasitas circulantes caiu para $2,6 \text{ parasitas} \times 10^{-4}/\text{ml}$.

No grupo quimera WT/KO, 27% dos animais (5 de 18) positivaram no dia 23 p.i. (Média: $1,06 \text{ parasitas} \times 10^{-4}/\text{ml}$). No dia 29 p.i. todos os animais do grupo WT/KO estavam positivos e o número de parasitas no sangue foi aumentando em todos os animais até o dia do sacrifício. O sacrifício dos animais deste experimento foi realizado aleatoriamente em três dias diferentes. Os dados individuais podem ser observados na Tabela 3.

Nos animais dos grupos WT (03 animais) e WT/WT (15 animais), as parasitemias nunca positivaram até o final do experimento e nenhum animal morreu espontaneamente. Houve diferenças estatísticas entre WT/WT vs WT/KO, nos dias 27, 29 e 31 p.i. com $p < 0,05$.

Figura 23. Correlação entre o nível de reconstituição e número de parasitas circulantes no sangue de animais WT/KO da 3ª experiência. O valor da carga parasitária apresentado é a média dos valores de parasitemias a partir do dia de posituação (dia 20 p.i.) até o primeiro dia do sacrifício dos animais (dia 27 p.i.). A. Correlação respeito às células CD3^+ . B. Correlação respeito às células B220^+ .

Cabe anotar que novamente, não foi observada uma correlação inversa entre o nível de reconstituição das quimeras WT/KO e a parasitemia (Figura 23 A e B). Assim, os 5 animais com índice de reconstituição menor de 20% e a maior parte dos animais com reconstituição acima de 20% apresentaram baixos níveis de

parasitemia, enquanto que os 3 animais que apresentaram parasitemias maiores tiveram índices de reconstituição entre 37 e 56% (Tabela 3).

A pesar de termos planejado realizar esta experiência com um número elevado de animais tivemos uma perda acidental dos blocos de histologia de alguns dos animais (identificados com asterisco na Tabela 3). Assim, a análise histopatológica da 3ª experiência é mais reduzida que as análises de reconstituição e parasitemia.

Tabela 3A. Resultados da 3ª experiência. Quimeras em fundo C57BL/6. Infecção com T. cruzi da cepa Sylvio X10/4.

Grupos	Análise quimerismo		PARASITEMIA														Dia do	Peso baço	Patologia						
			dias																coração		fígado		músculo estriado		
	6	8	10	12	14	16	18	20	23	25	26	27	29	31	Sacrifício	mgs	infiltrado	ninhos	infiltrado	ninhos	infiltrado	ninhos			
	%CD3	IFNgR+	% B220	FNgR+																					
KO				0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	8	0	27	200	1.25	4.00	3	1	2.00	3.00		
KO				0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	3	0	27	230	3.75	40.00	3	0	2.25	0.00		
KO				0	0	0	0	0	0	0	0	6	18	6	0	27	170	0.50	15.00	3	1	0.75	3.00		
KO				0	0	0	0	0	0	0	2	3	6	3	0	27	290	4.00	47.00	3	0	3.25	2.00		
KO				0	0	0	0	0	0	0	1	3	4	1	0	27	170	3.00	97.00	3	0	2.00	1.00		
WT/WT							0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	120	3.75	2.00	2	0	1.50	0.00		
WT/WT							0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	140	3.25	7.00	1	0	2.75	0.00		
WT/WT							0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	160	1.25	0.00	2	0	0.50	0.00		
WT/WT							0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	120	1.25	0.00	2	0	2.50	1.00		
WT/KO	8.62	0.57		0	0	0	0	0	0	0	1	4				27	120	4.00	100.00	3	0	1.75	0.00		
WT/KO	37.92	37.29				0	3	13	42	12						27	220	1.00	72.00	4	0	1.50	2.00		
WT/KO	8.16	1.33		0		0	0	0	0	0	5					27	180	3.00	30.00	3	2	1.50	0.00		
WT/KO	38.40	33.63				0	0	0	2	3						27	250	2.50	48.00	3	0	3.00	3.00		
WT/KO	44.31	31.20				0	0	0	1	0						27	230	3.25	16.00	3	0	3.00	0.00		
WT/KO	58.81	44.22				0	10	32	4	18						27	180	1.25	59.00	3	0	0.50	0.00		
WT/WT						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29	130	3.75	1.00	1	0	2.75	0.00		
WT/WT						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29	120	3.75	0.00	1	0	4.00	0.00		
WT/WT						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29	90	0.75	0.00	1	0	0.50	0.00		
WT/WT						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29	130	3.75	0.00	2	0	3.25	2.00		
WT/WT						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29	100	3.25	0.00	1	0	1.75	0.00		
WT/KO	27.28	23.53				0	0	0	0	0	1	1	26			29	110	4.00	100.00	4	0	2.00	2.00		
WT/KO	16.45	1.42	0			0	0	0	0	0	12	5				29	140	1.50	59.00	2	0	2.75	19.00		
WT/KO	3.52	1.49	0			0	0	0	0	3	1	63				29	180	4.00	100.00	2	0	2.25	1.00		
WT/KO	64.08	56.96				0	0	0	0	0	3	26				29	280	4.00	46.00	3	0	3.25	7.00		
WT/KO	38.85	31.50				0	2	10	32	0	32					29	170	1.00	23.00	4	0	2.00	2.00		
WT/KO	35.11	15.79				0	0	0	1	3	2	8				29	200	4.00	100.00	3	0	3.25	1.00		

Continua

Tabela 3B. Resultados da 3ª experiência. Quimeras em fundo C57BL/6. Infecção com T. cruzi da cepa Sylvio X10/4.

Grupos	Análise quimerismo			PARASITEMIA														Dia do Sacrifício	Peso baço mgs	Patologia			
	%CD3 IFNgR+	% B220 FNgR+		dias																coração		fígado	
				6	8	10	12	14	16	18	20	23	25	26	27	29	31	infiltrado	ninhos	infiltrado	ninhos	infiltrado	ninhos
* WT																							
* WT																							
* WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							
*WT/WT																							

Conclusão

Figura 24. Análise comparativa do número de ninhos e infiltrados inflamatórios presentes no coração dos animais da 3ª experiência. Animais sacrificados nos dias 27 p.i. (grupo controle negativo KO, grupo quimera WT/WT e grupo quimera WT/KO) e 29 p.i. (grupos quimera WT/WT e quimera WT/KO). A. Número de ninhos no coração. B. Nível de miocardite. Infecção com 10^5 tripomastigotas da cepa Sylvio 10X/4 de *T. cruzi*. Intensidade do infiltrado: (0) nenhum infiltrado, (1) 1 - 10 infiltrados, (2) 11 - 20 infiltrados, (3) 21 - 30 infiltrados e (4) mais de 31 infiltrados. Existem diferenças estatísticas entre WT/WT e WT/KO, respeito ao número de ninhos presentes no coração: dia 27 p.i. ** $p < 0,005$; dia 29 p.i. *** $p < 0,001$.

O parasitismo cardíaco no grupo WT/KO, exibiu um número elevado de ninhos no dia 27 p.i., que aumentaram no dia 29 p.i. (Figura 24 A), entretanto, houve escassa presença de ninhos nas duas datas no grupo WT/WT, apresentando diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos, com $p < 0,005$ e $p < 0,001$, respectivamente, para cada data. As médias do número de ninhos presentes no coração no dia 27 p.i. para os grupos WT/WT e WT/KO foram 2,2 e 54,1

ninhos/corte histológico, respectivamente, e para o dia 29 p.i. foram 0,20 e 71,3 ninhos/corte histológico. A totalidade dos animais do grupo WT/KO mostrou parasitismo cardíaco e o 50% apresentaram um número de ninhos maior à média em cada uma das duas datas de sacrifício.

No grupo WT/WT só 50% (2 animais de 4) dos animais apresentaram ninhos no coração, e em baixo número, no dia 27 p.i., (ver Tabela 3), e no dia 29 p.i., um animal de 5 apresentou 1 ninho/corte histológico. No grupo KO o 60% dos animais (3 de 5), mostraram número de ninhos acima da média (média: 40 ninhos/corte histológico). Neste grupo, a análise do parasitismo cardíaco não mostrou diferença em relação à do grupo WT/KO no dia 27 p.i.

Já em relação à presença de infiltrados, no dia 27 p.i., os animais do grupo KO mostraram níveis homogêneos de infiltração leucocitária no coração, com média 2. Nos animais do grupo WT/KO, os infiltrados no coração no dia 27 p.i. apresentaram média 2 que aumentou para média 3 no dia 29 p.i. Não foram observadas diferenças estatísticas na intensidade do infiltrado cardíaco entre os grupos KO e WT/KO no dia 27 p.i., assim como entre os grupos WT/KO e WT/WT nas duas datas (Figura 24 B).

Se compararmos entre si os animais do grupo WT/KO, observamos que não há uma correlação direta absoluta entre carga parasitária cardíaca e parasitemia. Assim, a tabela 3 mostra que nem sempre os animais com elevado número de ninhos no coração apresentam os maiores valores de parasitemia, tanto no dia 27 p.i. como no dia 29 p.i. (isto sugere não serem totalmente análogos os controles dos parasitismos cardíacos e sanguíneos).

O grupo KO apresentou parasitemias positivas e número elevado de ninhos no coração, diferente do grupo WT/WT que mostrou alguns ninhos no coração, mas não apresentou tripomastigotas no sangue.

Figura 25. Análise comparativa entre número de ninhos e número de infiltrados inflamatórios no coração dos animais da 3ª experiência. Infecção com 10^5 tripomastigotas da cepa Sylvio 10X/4 de *T. cruzi*. A. Animais sacrificados no dia 27 p.i., grupo KO (5 animais), WT/WT (4 animais) e WT/KO (6 animais). B. Animais sacrificados no dia 29 p.i., grupo WT/WT (5 animais) e WT/KO (6 animais). Intensidade do infiltrado: (0) nenhum infiltrado, (1) 1 - 10 infiltrados, (2) 11 - 20 infiltrados, (3) 21 - 30 infiltrados e (4) mais de 31 infiltrados.

Ao correlacionar o número de infiltrados inflamatórios e o número de ninhos presentes no coração dos animais sacrificados no dia 27 p.i. (Figura 25 A) se observa que 60% do grupo KO (3 de 5 animais) apresenta um considerável número de infiltrados inflamatórios (acima de nível 3) e igualmente de ninhos. No grupo WT/KO, observamos similarmente uma resposta inflamatória alta (por volta de três) e número elevado de ninhos que variam entre 16 a 100. No grupo WTWT, entretanto, 50% do grupo apresenta uma forte resposta inflamatória com baixo número de ninhos. No dia 29 p.i. (Figura 25 B), as diferenças entre WT/WT e WT/KO são ainda mais nítidas. Assim, os animais do grupo WT/WT se caracterizam por mostrar alto número de infiltrados (80% do grupo apresentou infiltrados acima do nível 3) com escasso número de ninhos, enquanto que no grupo WT/KO se observa que tanto a resposta inflamatória como o número de ninhos aumentaram em relação ao dia 27 p.i., com 66% do grupo mostrando nível 4 de inflamação e número de ninhos acima de 100.

Figura 26. Análise comparativa do número de ninhos e infiltrados inflamatórios presentes no fígado dos animais da 3ª experiência. Animais sacrificados nos dias 27 p.i., grupo KO (5 animais), WT/WT (4 animais) e WT/KO (6 animais). Animais sacrificados no dia 29 p.i., grupo WT/WT (5 animais) e WT/KO (6 animais). Intensidade do infiltrado: (0) nenhum infiltrado, (1) 1 - 10 infiltrados, (2) 11 - 20 infiltrados, (3) 21 - 30 infiltrados e (4) mais de 31 infiltrados. A. Número de ninhos no fígado. Não houve diferenças estatísticas entre WT/WT vs WT/KO. B. Nível de hepatite. Há diferenças estatísticas entre WT/WT vs WT/KO, nos dias 27 e 29 p.i. respectivamente. *** $p < 0,0001$. ** $p < 0,005$.

No fígado, observamos que, nas datas analisadas, a carga parasitária foi baixa nos grupos KO e WT/KO e ausente no grupo WT/WT. No dia 27 p.i., o 40% (2 de 5) dos animais do grupo KO e 16% (1 de 6, com 2 ninhos/corte histológico) dos animais do grupo WT/KO apresentaram ninhos. No dia 29 p.i. nenhum dos grupos exibiu carga parasitária no fígado (Figura 26 A). Diferenças estatísticas não foram observadas.

Em relação ao grau de infiltração leucocitária no fígado, notamos que, no dia 27 p.i., 100% dos animais do grupo KO mostraram nível 3 de infiltração leucocitária (Figura 26 B). Por outro lado, os animais do grupo WT/KO mostraram nível de infiltração leucocitária com média de 3 no dia 27 p.i., que se mantém no dia 29 p.i. Já o grupo WT/WT apresenta um menor e decrescente grau de infiltração inflamatória com média de 1,75 e 1,25 nos dias 27 e 29 p.i., respectivamente, significativamente diferentes aos do grupo WT/KO.

Figura 27. Análise comparativa do número de ninhos e infiltrada inflamatórias presentes no músculo estriado esquelético nos animais da 3ª experiência. Animais sacrificados no dia 27 p.i., grupo KO (5 animais), WT/WT (4 animais) e WT/KO (6 animais). Animais sacrificados no dia 29 p.i., grupo WT/WT (5 animais) e WT/KO (6 animais). Infecção com 10^5 tripomastigotas da cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi*. A. Número de ninhos no músculo: não existem diferenças estatísticas entre WT/WT vs WT/KO no dia 27 p.i., mas no dia 29 p.i. observa-se uma tendência ($p=0,07$). B. Nível de miosite. Intensidade do infiltrado: (0) nenhum infiltrado, (1) 1 - 10 infiltrados, (2) 11 - 20 infiltrados, (3) 21 - 30 infiltrados e (4) mais de 31 infiltrados. Não existem diferenças estatísticas entre WT/WT vs WT/KO.

Respeito à presença de ninhos no músculo (Figura 27 A), observamos que no dia 27 p.i. 80% dos animais do grupo KO foram positivos (média: 1,80 ninhos/corte histológico). No grupo WT/WT só 25% do grupo (um animal de 4) apresentou um ninho (média 0,25 ninhos/corte histológico), e no grupo WT/KO evidenciaram-se ninhos em 33% (2 de 6 animais) dos animais do grupo (média 0,83 ninhos/corte histológico). No dia 29 p.i., somente 1 dos 5 animais WT/WT apresentou ninhos que, no entanto, foram observados na totalidade dos animais WT/KO. Assim, observou-se uma tendência dos animais WT/KO terem maior carga parasitária no quadríceps que os animais WT/WT.

De outro lado, observamos que todos os grupos apresentaram certo grau de miosite (Figura 27 B), sem diferenças estatísticas significativas. A miosite aumentou levemente do dia 27 p.i. para o dia 29 p.i. nos grupos WT/WT e WT/KO. As médias no dia 27 p.i. foram 2,05, 1,81 e 1,88, para os grupos KO, WT/WT e WT/KO respectivamente. No dia 29, as médias foram 2,45 e 2,48 para os grupos WT/WT e WT/KO, respectivamente.

Na análise histopatológica da 3ª experiência (mostrada acima) foram incluídos todos os animais. No entanto, como tivemos vários animais com reconstituição inferior a 10%, realizamos uma segunda análise na qual foram excluídos os animais com baixa reconstituição (ver anexo A e B). Nesta nova análise as conclusões e significância estatística foram idênticas às obtidas na primeira análise (ver anexo C).

6.7 4ª EXPERIÊNCIA: Avaliação do estado quimérico

De acordo como foi exposto no capítulo de materiais e métodos, quimeras WT/WT e WT/KO foram estabelecidas. Quatro grupos de animais foram formados:

- controles positivos: 3 animais C57Bl/6 (WT);
- controles negativos: 3 animais IFN γ R-KO em “background” C57BL/6(KO);

- quimeras WT/WT (WT/WT): 4 animais C57BL/6 irradiados com 1200 rads e reconstituídos via i.p. com 34×10^6 células da medula óssea obtidas de camundongos C57BL/6, em 300 μ l de RPMI 1640 sem S.F.B.;
- quimeras WT/IFN γ R-KO (WT/KO): 10 animais IFN γ R-KO irradiados com 1200 rads e reconstituídos via i.p. com 34×10^6 de células da medula óssea obtida de camundongos C57BL/6, em 300 μ l de RPMI 1640 sem S.F.B.

Oito semanas após a irradiação/reconstituição, foi realizado o teste de avaliação do estado quimérico, conforme foi descrito no capítulo de materiais e métodos.

Figura 28. Análise da frequência de células IFN γ R⁺ nas populações de células CD3⁺ e B220⁺ nos camundongos da 4ª experiência. Oito semanas após a transferência de medula óssea foi analisada a frequência de células IFN γ R⁺ nas populações de células CD3⁺ e B220⁺ do sangue periférico, em animais quiméricos e controles. *** p<0,001.

Inicialmente os grupos WT/WT e WT/KO foram constituídos por um número muito maior de animais, mas, devido a um problema técnico apresentado com o equipamento de irradiação do ICB, devimos realizar a irradiação no IPEN. Esta

irradiação provocou a morte de grande parte dos animais do grupo WT/WT e de alguns animais WT/KO, reduzindo assim o grupo experimental.

Na avaliação do estado quimérico, descrita anteriormente no capítulo de materiais e métodos, realizada às oito semanas após a irradiação/ reconstituição, observamos como esperado, que o grupo KO apresenta baixa frequência de células $CD3^+ IFN\gamma R^+$ e células $B220^+ IFN\gamma R^+$ (Figura 28). Distintamente, os animais dos grupos controle WT e quimera WT/WT, indicaram uma elevada expressão do $IFN\gamma R^+$ para as populações $CD3^+$ e $B220^+$.

A reconstituição no grupo quimera WT/KO (10 animais) foi bastante homogênea, pois a frequência de células $CD3^+ IFN\gamma R^+$ oscilou entre 81% e 51% e para a população de células $B220^+ IFN\gamma R$ oscilou entre 95% e 74%.

Diferenças estatísticas foram observadas entre o grupo de animais WT comparado frente ao grupo de animais KO com $p < 0,001$ e entre o grupo de animais WT/WT e WT/KO com $p < 0,001$, neste último caso, foi observado só respeito à frequência de células $CD3^+ IFN\gamma R^+$ (Figuras 28 e 29).

Figura 29. Percentagem de reconstituição de células $CD3^+ IFN\gamma R^+$ e $B220^+ IFN\gamma R^+$ da 4ª experiência. Oito semanas após a transferência de medula óssea, foi analisada a percentagem de reconstituição, no sangue de animais quiméricos e controles. A. Expressão de $IFN\gamma R$ em células $CD3^+$. B. Expressão de $IFN\gamma R$ em células $B220^+$.

A população de células $CD3^+$ apontou uma média de frequência de expressão do $IFN\gamma R$ de 67% e de 89% para a população $B220^+$.

A expressão de IFN γ R no grupo WT/WT esteve acima de 95% para as duas populações (Figura 29), e não houve diferença estatística com o grupo WT.

Os valores de reconstituição no grupo WT/KO são homogêneos para as duas populações linfocitárias, e nenhum animal se mostrou abaixo de 20% de reconstituição. Assim como aconteceu na 1ª e 2ª experiência e distintamente da 3ª experiência, a expressão de IFN γ R nas células B220⁺ dos animais WT/KO foi maior do que nas células CD3⁺ (Figuras 28 e 29).

Posteriormente à confirmação do estado quimérico dos animais WT/KO, foi realizada a infecção com tripomastigotas de cultura da cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi*.

6.8 4ª EXPERIÊNCIA: Avaliação da infecção pelo *T. cruzi*

Depois de avaliar a eficiência da reconstituição, camundongos WT/KO, WT/WT, C57BL/6 e IFN γ R-KO em “background” C57BL/6 foram infectados com 100.000 formas de *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4, via endovenosa (plexo oftálmico) em um volume de 300 μ l de R.P.M.I. sem S.F.B.

Os animais foram tratados com antibiótico como descrito no capítulo de matérias e métodos, evitando assim infecções secundárias que poderiam se agravar com a manipulação durante a realização da experiência.

Curvas de parasitemia (4ª Experiência)

Figura 30. Análise comparativa da carga parasitaria em camundongos dos grupos controle negativo (IFN γ R-KO), controle positivo (C57BL/6), quimera WT/WT e quimera WT/KO da 4ª experiência. Os animais foram infectados com 10^5 tripomastigotas da cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi* e as parasitemias analisadas em diferentes dias da infecção. Os números na figura indicam o número de animais positivos do total de animais do grupo. Existem diferenças estatísticas entre KO vs WT/KO e entre WT/WT vs WT/KO. $p < 0,05$.

As parasitemias do grupo WT/KO positivaram o dia 23 p.i. Em 80 % do grupo (8 de 10 animais), e foram aumentando até o final da experiência. Para a primeira data de sacrifício, dia 29 p.i. a média foi $5,5 \text{ parasitas} \times 10^{-4}$ e para a segunda data de sacrifício (dia 32 p.i.) a média foi $7,5 \text{ parasitas} \times 10^{-4}$. Um animal nunca positivou até o final da experiência (Figura 30). Um dos animais deste grupo, apesar de apresentar parasitemia positiva (dia 29 p.i., $7 \text{ parasitas} \times 10^{-4}$), se mostrou negativo o dia 31 p.i., voltando a mostrar o mesmo número de parasitas no sangue no dia seguinte (32 p.i.) (ver Tabela 4).

Nos animais do grupo controle KO, as parasitemias positivaram o dia 12 p.i. (2 animais de 3), com média: $1 \text{ parasita} \times 10^{-4}$, e todos os animais estavam positivos no dia 14 com média: $1,67 \text{ parasitas} \times 10^{-4}$. A análise individual (Tabela 4) mostrou que a parasitemia dos animais deste grupo apresenta uma curva ondulante, com dois ou três picos marcados, que não são, entretanto perceptíveis quando

observamos a média do grupo. Os animais KO foram sacrificados o dia 29 p.i., com média: 22,3 parasitas $\times 10^{-4}$ (Figura 30). O perfil ondulante da curva de parasitemia pode ser também intuído (com intensidade muito menor do que no grupo KO) em alguns dos animais do grupo WT/KO.

Nos grupos WT e WT/WT o 100% dos animais jamais positivaram durante toda a experiência.

Diferenças estatísticas foram encontradas entre os grupos KO vs WT/KO, nos dias 12, 14, 15, 23, 25, 27 e 29 p.i., ($p < 0,05$) e entre os grupos WT/WT vs WT/KO nos dias 25, 27, 29, 31 e 32 p.i., ($p < 0,05$).

Figura 31. Correlação entre o nível de reconstituição e número de parasitas circulantes no sangue dos animais WT/KO da 4ª experiência. O valor da carga parasitária apresentado é a média dos valores de parasitemias a partir do dia de posituação (dia 12 p.i.) ate o primeiro dia do sacrifício dos animais (dia 29 p.i.). A. Correlação respeito às células CD3⁺. B. Correlação respeito às células B220⁺.

Ao correlacionar a percentagem de expressão de IFNγR nas células CD3⁺ e B220⁺, se observa que tomando o conjunto dos animais dos quatro grupos há correlação inversa entre a percentagem da expressão do receptor para o IFNγ e os níveis de parasitemia (Figura 31 A). No entanto, quando a análise se restringe aos animais do grupo WT/KO não parece existir uma forte correlação entre a intensidade da reconstituição e a parasitemia (Figura 31 B).

Figura 32. Análise comparativa do número de ninhos e infiltrados inflamatórios presentes no coração dos animais da 4ª experiência. Animais sacrificados nos dias 29 p.i. (grupo controle negativo KO, grupo quimera WT/WT e grupo quimera WT/KO) e 32 p.i. (grupos quimera WT/WT e quimera WT/KO). A. Número de ninhos no coração. B. Nível de miocardite. Infecção com 10^5 tripomastigotas da cepa Sylvio 10X/4 de *T. cruzi*. Intensidade do infiltrado: (0) nenhum infiltrado, (1) 1 - 10 infiltrados, (2) 11 - 20 infiltrados, (3) 21 - 30 infiltrados e (4) mais de 31 infiltrados. Existem diferenças estatísticas entre WT/WT e WT/KO, respeito ao número de infiltrados e ninhos presentes no coração. Dia 32 p.i. *** $p < 0,005$.

Os animais dos grupos KO (dia 29 p.i.) e WT/KO (dias 29 e 32 p.i.) revelaram a presença de elevado número de ninhos no tecido cardíaco; contudo, na média o parasitismo cardíaco do grupo WT/KO no dia 29 p.i. (média: 74 ninhos/corte histológico) foi similar ao do que o grupo KO (87,7 ninhos/corte histológico). No dia 32 p.i., o número de ninhos no grupo WT/KO sofreu um aumento em relação ao observado no dia 29 p.i.

O 100% dos animais do grupo WT/KO mostrou parasitismo cardíaco e no dia 32 p.i., 66% (4 de 6 animais) deste grupo tiveram um número de ninhos superior a 100 ninhos/corte histológico. Embora a parasitemia fosse mais elevada do grupo KO do que no grupo WT/KO, no coração as diferenças na carga parasitária destes dois grupos não foram tão marcadas (Tabela 4).

Distintamente, o parasitismo cardíaco nos grupos WT e WT/WT se caracterizou pela ausência de ninhos nas duas datas de sacrifício, na totalidade dos animais. Diferenças estatísticas significativas foram observadas no dia 32 p.i., se comparados o grupo WT/WT e o grupo WT/KO, com $p < 0,005$.

Em relação à presença de infiltrados no coração no dia 29 p.i. (Figura 32 B), uma alta infiltração leucocitária foi observada no grupo KO (média: 3,8), assim como no grupo WT/KO (média: 3,3). Já no dia 32 p.i., o número de infiltrados no grupo WT/KO aumentou discretamente apresentando média de 3,6. Para este mesmo dia, os animais dos grupos WT e WT/WT apresentaram infiltração leucocitária menos intensa com média de 2,5 e 1,8 para cada grupo de animais respectivamente. Diferenças estatísticas foram observadas entre os grupos WT/WT vs WTKO, com $p < 0,005$.

Figura 33. Correlação entre parasitemias e número de ninhos presentes no coração dos animais da 4ª experiência. Infecção com 10^5 tripomastigotas da cepa Sylvio 10X/4 de *T. cruzi*. A. Animais sacrificados no dia 27 p.i., (4 animais) e no dia 29 p.i (6 animais), do grupo WT/KO. Os valores das parasitemias foram promediadas a partir do dia em que cada animal se positivou e até o dia do sacrifício.

Correlacionando os parâmetros de carga parasitária sistêmica e local, observamos que nos animais do grupo WT/KO não há uma correlação direta entre o nível de parasitemia e o número de ninhos no coração (Figura 33).

Figura 34. Análise comparativa entre número de ninhos e número de infiltrados inflamatórios no coração dos animais da 4ª experiência. Infecção com 10^5 tripomastigotas da cepa Sylvio 10X/4 de *T. cruzi*. A. Animais sacrificados no dia 29 p.i., grupo KO (3 animais) e WT/KO (4 animais). B. Animais sacrificados no dia 32 p.i., grupo WT (3 animais), WT/WT (4 animais) e WT/KO (6 animais). Intensidade do infiltrado: (0) nenhum infiltrado, (1) 1 - 10 infiltrados, (2) 11 - 20 infiltrados, (3) 21 - 30 infiltrados e (4) mais de 31 infiltrados.

No grupo WT/KO se observa um elevado número de ninhos acompanhado de um considerável número de infiltrados inflamatórios, nas duas datas de sacrifício. Este evento pode ser notado também no grupo KO, no dia 29 p.i. Distintamente, no dia 32 p.i., os grupos WT e WTWT se apresentam com ausência de ninhos e uma resposta inflamatória que apesar de clara é inferior à dos animais WT/KO (Figura 34).

Figura 35. Análise comparativa do número de ninhos e infiltrados inflamatórios presentes no fígado dos animais da 4ª experiência. Animais sacrificados no dia 29 p.i., grupo KO (3 animais) e WT/KO (4 animais) e no dia 32 p.i., grupo WT (3 animais), grupo WT/WT (4 animais) e WT/KO (6 animais). Intensidade do infiltrado: (0) nenhum infiltrado, (1) 1 - 10 infiltrados, (2) 11 - 20 infiltrados, (3) 21 - 30 infiltrados e (4) mais de 31 infiltrados. A. Número de ninhos no fígado. Não houve diferenças estatísticas entre WT/WT vs WT/KO. B. Nível de hepatite. Há diferenças estatísticas entre KO e WT/KO e WT/WT vs WT/KO, nos dias 29 e 32 p.i. respectivamente. ** $p < 0,001$.

Nas duas datas de sacrifício, não se evidenciaram ninhos no fígado em nenhum dos grupos (Figura 35 A).

Em relação ao grau de infiltração leucocitária no fígado, observamos que o fígado foi um dos órgãos mais afetados da experiência 4. No grupo KO, o 100% dos animais mostraram infiltração leucocitária acima do nível 3 (média: 3,5) no dia 9 p.i. Já os animais do grupo WT/KO mostraram nesta data um nível menor (média: 2,6)

(Figura 35 B). No dia 32 p.i., a inflamação hepática aumentou nos animais do grupo WT/KO (média: 3,8), atingindo níveis muito superiores aos dos animais dos grupos WT/WT (média: 1,9) e WT (média: 1).

Figura 36. Análise comparativa do número de ninhos e infiltrados inflamatórios presentes no músculo estriado esquelético nos animais da 4ª experiência. Animais sacrificados no dia 29 p.i., grupo KO (3 animais), WT/KO (4 animais) e no dia 32 p.i., grupo WT (3 animais), grupo WT/WT (4 animais) e WT/KO (6 animais). Infecção com 10^5 tripomastigotas da cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi*. A. Número de ninhos no músculo: no dia 32 p.i., observa-se uma tendência ($p=0,07$); B. Nível de miosite. Intensidade do infiltrado: (0) nenhum infiltrado, (1) 1 - 10 infiltrados, (2) 11 - 20 infiltrados, (3) 21 - 30 infiltrados e (4) mais de 31 infiltrados. Dia 29 p.i., existe diferença estatística entre KO vs WT/KO, $p<0,005$.

No músculo esquelético, no dia 29 p.i., a presença de ninhos foi evidenciada em 66% dos animais do grupo KO (média: 6,7 ninhos/corte histológico) e em

nenhum dos animais do grupo WT/KO (Figura 36 A). As diferenças entre estes grupos não foram significativas, mas observou-se uma tendência ($p=0,079$). No dia 32 p.i., observou-se carga parasitária positiva no músculo de 66% dos animais do grupo WT/KO (4 de 6 animais, com média: 5,5 ninhos/corte histológico), mas em nenhum dos animais WT/WT e WT. As diferenças não foram significativas, mas o grupo WT/KO exibiu uma tendência a mostrar maior número de ninhos que o grupo WT/WT com $p=0,076$.

Em relação ao infiltrado inflamatório apresentado no dia 29 p.i., notamos que o grupo KO apresentou altos níveis de miosite, com média de 3,7, e o grupo WT/KO mostrou níveis menores (média de 2,3), com diferenças significativas entre os grupos ($p<0,005$). No dia 32 p.i., os grupos WT e WT/WT mostraram níveis de miosite próximos, com médias de 2,3 e 2,4, respectivamente. Já no grupo WT/KO, a infiltração leucocitária aumentou em relação ao dia 29 p.i., exibindo uma média de 3,2. Neste grupo o 100% dos animais exibiram infiltração, e 83% dos animais apresentaram valores dentro da média de infiltração leucocitária para o grupo. Contudo, não houve diferença estatística do grupo WT/KO frente ao grupo WT/WT.

Tabela 4. Resultados da 4ª experiência. Quimeras em fundo C57BL/6. Infecção com T. cruzi da cepa Sylvio X10/4.

Grupos	Análise do quimerismo		PARASITEMIA																Dia do	Peso Baço	Patologia					
			dias																		coração		Fígado		Músculo estriado	
	% CD3 IFNgR+	%B220 IFNgR +	7	10	12	14	15	17	19	21	23	25	27	29	31	32	sacrifício	mg	infiltrado	ninhos	infiltrado	ninhos	infiltrado	ninhos	infiltrado	ninhos
KO			0	0	0	2	1	2	0	1	8	22	8	9			29	300	4.00	100	3.50	0	3.50	0	3.50	0
KO			0	0	1	1	2	0	0	1	9	32	6	7			29	180	3.75	100	3.50	0	3.50	0	3.50	4
KO			0	0	2	2	2	0	2	64	28	19	40	51			29	130	3.50	63	3.50	0	4.00	0	4.00	16
WT/KO	68.53	88.41		0	0	0	0	0	0	3	2	6	10			29	60	3.00	85	3.00	0	3.00	0	1.75	0	0
WT/KO	61.65	90.79		0	0	0	0	0	0	1	1	3	3			29	130	3.25	15	2.50	0	3.00	0	3.00	0	0
WT/KO	61.97	90.11		0	0	0	0	0	0	10	10	10	11			29	70	4.00	100	2.50	0	2.00	0	2.00	0	0
WT/KO	74.04	90.78		0	0	0	0	0	0	2	5	5	6			29	100	2.75	96	2.50	0	2.50	0	2.50	0	0
WT				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	110	2.75	0	1.00	0	2.00	0	2.00	0
WT				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	130	2.25	0	1.00	0	3.50	0	3.50	0
WT				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	110	2.50	0	1.00	0	1.50	0	1.50	0
WT/ WT				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	80	2.00	0	3.00	0	3.00	0	3.00	0
WT/WT				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	70	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0
WT/WT				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	110	2.50	0	1.00	0	3.00	0	3.00	0
WT/WT				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	80	1.50	0	2.50	0	2.50	0	2.50	0
WT/KO	64.16	87.13		0	0	0	0	0	0	1	4	7	6	8	7		32	50	3.50	100	4.00	0	3.50	0	3.50	0
WT/KO	69.66	91.93		0	0	0	0	0	0	2	6	5	11	11		32	50	3.75	15	4.00	0	1.00	0	1.00	0	0
WT/KO	77.64	93.33		0	0	0	0	0	0	1	7	3	4	7	8		32	80	3.00	62	4.00	0	3.75	4	3.75	4
WT/KO	64.49	92.59		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		32	90	3.75	100	4.00	0	4.00	13	4.00	13
WT/KO	51.27	74.62		0	0	0	0	0	0	2	7	1	3	10	12		32	100	4.00	100	4.00	0	3.75	15	3.75	15
WT/KO	81.5	95.24		0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	7	7		32	110	3.50	100	3.00	0	3.00	1	3.00	1

Figura 37 Patologia cardíaca (aurícula). A. corte histológico da aurícula de camundongo KO (40x); note-se a presença de pericardite, ninhos e infiltrados inflamatórios. B. corte histológico da aurícula de camundongo WT/KO, (40x). Note-se a presença de ninhos acompanhados de infiltrados inflamatórios.

Figura 38 Patologia cardíaca (aurícula). A. corte histológico da aurícula de camundongo WT/KO (20x); note-se a presença de pericardite, alto número de ninhos e infiltrados inflamatórios. B. corte histológico da aurícula de camundongo WT/WT (20x); note-se a presença de escassa pericardite, ausência de ninhos e escassos infiltrados inflamatórios.

Figura 39. Patologia cardíaca: Corte histológico do ventrículo de camundongo WT/KO, (20x). No inserto, ninhos e infiltrados inflamatórios.

Figura 40. Patologia hepática. A-B. Corte histológico do fígado de um camundongo WT/WT sem infiltrados inflamatórios (A: 10x; B: 20x) C-D. Corte histológico do fígado de camundongo WT/KO com infiltrados inflamatórios, (C: 10x; D: 20x).

Figura 41. Patologia da musculatura esquelética estriada. Corte histológico do quadríceps de camundongo WT/KO com ninho e infiltrado inflamatório. 40X.

Quadros resumo das diferenças estatísticas entre WT/KO e WT/WT ou entre WT/KO e KO podem ser consultados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 6. Estatística dos resultados de WT/KO (em relação à KO)

Experiência	Dia p.i.	Cepa usada na infecção	Via de inóculo	Patologia					
				CORAÇÃO		FÍGADO		MÚSCULO	
				ninhos	infiltrado	ninhos	infiltrado	ninhos	infiltrado
1ª	13	SylvioX10/4	i.p.	=	=	=	=	=	=
2ª	13 vs 12 (*)	Y	i.p.	↓ (*)	↑ (*)	↓ (*)	↓ (*)	=	=
3ª	27	SylvioX10/4	i.v.	=	=	=	=	↗	=
4ª	29	SylvioX10/4	i.v.	=	↘	=	↓	↗	↓ (p<0,005)

↓
↑
↑
=

Acompanha a hipótese de trabalho

↑
↑
=

Não acompanha a hipótese de trabalho

↑
↑
=

Presença de infiltrado inflamatório ou ninhos (segundo o caso) sem diferença estatística

↑
↑
=

Ausência de infiltrado inflamatório ou ninhos (segundo o caso) sem diferença estatística

↑
↑
=

Tendência ao aumento ou diminuição

↑
↑
=

Intraperitoneal
Intravenoso

i.p.
i.v.

7 DISCUSSÃO

Apesar de conhecermos com bastante detalhe a participação dos diferentes elementos do sistema imune no controle do *T. cruzi* (BRENER e GAZZINELLI, 1997; MINOPRIO e JOSKOWICZ, 1991) desconhecemos qual o papel das células não leucocitárias. Uma vez que o IFN γ é uma das citocinas mais importantes no controle do *T. cruzi*, operando através de um amplo leque de ações efectoras, temos analisado se esta citocina estimula as células não leucocitárias a exercer direta ou indiretamente um papel efector sobre o parasita.

Com este objetivo, no presente projeto temos avaliado se o modelo experimental de quimeras de medula óssea é adequado para analisar o papel do IFN γ sobre as populações não leucocitárias. Camundongos IFN γ R-KO em fundo C57BL/6 foram irradiados e reconstituídos com medula óssea de camundongos C57BL/6. A escolha do “background” C57BL/6 foi motivada pela nossa necessidade de trabalharmos com uma linhagem resistente ao *T. cruzi*. Quimeras WT/WT foram estabelecidas como controle. Após confirmação do quimerismo, os animais foram infectados pelo *T. cruzi* das cepas Sylvio X10/4 ou Y.

Excetuando a quarta experiência na qual tivemos valores homogêneos de reconstituição, as três primeiras experiências exibiram níveis muito dispares de reconstituição para as células T e B. Na primeira experiência os animais com baixa reconstituição mostraram comportamento análogo aos KOs e foram excluídos. Nas experiências 2 e 3, entretanto, mantivemos os animais com taxa de reconstituição inferior a 20%, e isto não alterou as conclusões obtidas. No seu conjunto, 5 animais com reconstituição abaixo (ou próxima a 20%) foram mantidos na avaliação (1 na experiência 2, e 4 na experiência 3). Desconhecemos o porquê da disparidade na reconstituição entre animais de uma mesma experiência, mas cabe a possibilidade de existir algum erro na calibração do irradiador do ICB, que foi a máquina utilizada para obter das quimeras das 3 primeiras experiências.

Em três das quatro experiências chama a atenção que a percentagem de reconstituição por células IFN γ R⁺ foi discretamente maior nas células B do que nas células T. Consideramos isto seja um artefato, uma vez que a maior frequência de células B IFN γ R⁺ foi também observada nos controles negativos KO. Enquanto que um falso positivo poderia resultar da ligação não específica do anticorpo anti-IFN γ R

aos receptores FcγRIIb expressos pelas células B, estudos em humanos têm mostrado que após transplante de medula óssea, a reconstituição acontece mais cedo nas células B e células CD8⁺ do que nas células CD4⁺ (GEDDES, 2007; ISAACS et al., 2004).

Os resultados das parasitemias indicam que os animais WT/KO são mais susceptíveis ao *T. cruzi* do que os animais WT/WT, e mais resistentes do que os animais KO. Isto foi visivelmente evidenciado na 2ª, 3ª e 4ª experiência e mostrou-se como uma tendência na primeira. Mais ainda, o maior parasitismo tissular no coração, fígado e no músculo esquelético dos animais WT/KO constitui uma prova adicional da maior susceptibilidade destes animais. A maior susceptibilidade ao *T. cruzi* dos animais WT/KO indica que o IFNγ sinaliza as células não leucocitárias a promover direta ou indiretamente o controle do parasita. Acreditamos que a maior susceptibilidade dos animais WT/KO não seja o resultado da uma reconstituição incompleta. Esta afirmação tem como base a ausência de uma correlação inversa entre o grau de reconstituição e a parasitemia / parasitismo tissular dos diferentes animais. Acreditamos que garantido um nível basal de reconstituição, o animal WT/KO se comporte em forma semelhante, independentemente da reconstituição ter sido completa ou não. Isto é ilustrado claramente na primeira experiência, na qual o animal com maior reconstituição exibe os níveis mais elevados de parasitemia e parasitismo tissular do grupo WT/KO. Mais ainda, na experiência 2, o único animal com reconstituição baixa (17% de reconstituição nas células CD3⁺) mostra o menor parasitismo tissular. Na quarta experiência os valores de R² da curva de regressão mostram valores muito baixos, pouco ou nada sugestivos de uma correlação entre reconstituição e parasitemia. Contudo, como citado acima, os três animais WT/KO da primeira experiência que foram excluídos da análise em função da sua baixa reconstituição (<5%; ver Figura 1), se comportaram, após infecção, como animais KO (dados não mostrados). De qualquer forma, no conjunto, os resultados indicam que o aumento de susceptibilidade ao *T. cruzi* das quimeras WT/KO (em relação às quimeras WT/WT) não é devido a uma reconstituição leucocitária incompleta. Em consequência, os resultados validam a abordagem experimental de quimeras WT/KO e confirmam a nossa hipótese da ação do IFNγ sobre as células não leucocitárias.

Além de um maior parasitismo sistêmico e tissular, os animais WT/KO apresentam infiltrados inflamatórios no coração, fígado e músculo esquelético. A análise das eventuais diferenças na intensidade dos infiltrados entre os animais WT/KO e WT/WT é um assunto complexo. A princípio consideramos seja difícil obtermos conclusões precisas a este respeito, em parte porque na infiltração leucocitária depende da produção local de quimiocinas, processo ao qual contribuem diversos elementos, como complemento, macrófagos tissulares e células estruturais que são ativados pela interação com o parasita/moléculas do parasita. Mais ainda, após o recrutamento dos primeiros leucócitos, estes se somam aos elementos residentes na sua capacidade de produção de quimiocinas. Neste contexto altamente complexo, o IFN γ pode potencializar a produção de quimiocinas por alguns dos elementos leucocitários e não leucocitários. Por outro lado, a produção de quimiocinas também é diretamente influenciada pelo tamanho da carga parasitária local e não podemos esquecer que esta está aumentada nos camundongos WT/KO (em relação aos camundongos WT/WT).

Para facilitar a análise dos resultados de infiltração leucocitária discutiremos separadamente os resultados para cada órgão. No **coração**, os animais WT/KO mostraram (em relação aos animais WT/WT) níveis semelhantes de infiltração e carga parasitária na 1ª exp., níveis inferiores de infiltrado (apesar da maior carga parasitária) na 2ª exp., níveis semelhantes de infiltrado (apesar da maior carga parasitária) na 3ª exp. e níveis superiores de infiltração e carga parasitária na 4ª exp. No seu conjunto estes resultados são compatíveis com uma tendência dos animais WT/KO a exibirem no coração uma resposta inflamatória discretamente inferior à dos animais WT/WT frente à mesma carga parasitária. No **músculo esquelético**, os resultados e conclusões são semelhantes às do coração. Assim, os animais WT/KO mostram menor infiltrado no músculo esquelético que os WT/WT (apesar de exibirem a mesma carga parasitária) na 1ª experiência, ausência de ninhos e de infiltrados na 2ª experiência, níveis semelhantes de infiltrado (apesar da maior carga parasitária) na 3ª experiência, e uma tendência a exibirem maior infiltração e carga parasitária na 4ª experiência.

Já em relação ao **fígado**, resulta mais difícil especular se os animais WT/KO mostram tendência a exibir menor infiltrado do que os animais WT/WT frente à

mesma carga parasitária local. Acreditamos que esta limitação deva-se em parte ao fato da colonização e resposta inflamatória hepática ter se iniciado muito antes à data de sacrifício dos animais. Estudos anteriores de nosso laboratório têm mostrado que o fígado se afeta muito cedo na infecção pelo *T. cruzi*. Assim, aos 5 dias de infecção de camundongos C57BL/6 por parasitas Sylvio X10/4 já observamos inflamação hepática intensa com presença de ninhos, enquanto que neste momento não existe o menor indicio de colonização pelo parasita, ou de resposta inflamatória a este, no coração ou músculo estriado (dados não publicados). Mais ainda, a importância das células estruturais como elementos produtores de quimiocinas em resposta ao IFN γ deve ser menor no fígado, órgão que contém a grande população das células de Kupffer que são elementos de origem leucocitário e devem ter sido parcialmente substituídos por células IFN γ R⁺ nas quimeras WT/KO. Por outro lado, o fígado constitui um local onde a resposta ao IFN γ deve acontecer em forma intensa e rápida, dado que contém populações leucocitárias residentes pré-ativadas, tais como linfócitos NK-T, linfócitos T $\gamma\delta$ ⁺ e linfócitos NK, que produzem IFN γ (SARDINHA et al., 2006). Assim, o reconhecimento local do *T. cruzi* por estes linfócitos deve determinar prontamente a secreção de IFN γ , que poderia sinalizar células de Kupffer (e talvez também as células estruturais) a controlar a proliferação local do parasita.

Assim, podemos pensar que no coração e no músculo estriado a infiltração depende da ação das células não leucocitárias, enquanto que no fígado depende mais das células de Kupffer e linfócitos residentes que das células não leucocitárias. Desta forma, não é surpreendente que no nosso estudo não se observem diferenças claras no grau de infiltração hepática entre os animais dos grupos WT/KO e WT/WT.

Como discutido acima, os nossos resultados claramente indicam que os camundongos WT/KO apresentam maior susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* que os animais WT/WT, que se expressa por um aumento na carga parasitária sistêmica e nos diversos órgãos estudados. Estes resultados indicam que as células estruturais (não leucocitárias) respondem ao IFN γ propiciando um maior controle do parasita. Mas será que o quadro de susceptibilidade acrescentado ao *T. cruzi* observado nos animais WT/KO pode ser aplicado a todos os órgãos analisados neste estudo? A princípio a resposta é sim, mas devemos ser cautelosos em relação

ao coração e músculo esquelético uma vez que nestes órgãos a colonização pelo *T. cruzi* e o desenvolvimento da patologia se iniciam posteriormente ao envolvimento hepático. Assim, é difícil descartar que o maior número de ninhos observado no coração e músculo esquelético dos animais WT/KO não seja secundário a uma colonização mais intensa deste órgão em decorrência ao aumento na parasitemia. Neste sentido a infecção por parasitas da cepa Sylvio X10/4 representa a escolha mais apropriada para testar o modelo de quimeras WT/KO, já que na infecção pelo *T. cruzi* da cepa Y os níveis de parasitemia são muito mais elevados.

Diversos são os órgãos e populações estruturais que podem estar envolvidos no efeito protetor do IFN γ frente ao *T. cruzi*. Análise por microscopia de fluorescência realizada no nosso laboratório mostrou que as fibras musculares cardíacas de animais WT ou WT/WT expressam intensamente o receptor de IFN γ (dados não mostrados, que correspondem à tese de mestrado de Daniella Bucci). Detalhes desta marcação, assim como a confirmação da positividade do parênquima hepático e músculo esquelético estão sendo realizadas. Hepatócitos, fibroblastos, células epiteliais, células do endotélio vascular, miócitos e cardiomiócitos, são alguns exemplos de populações não leucocitárias que poderiam ser ativados pelo IFN γ a produzirem mediadores com atividade tripanostática ou tripanocida ou atividade quimiotática que favoreçam indiretamente a eliminação do parasita.

8 CONCLUSÕES

- 1 O grupo WT/KO manifesta maior susceptibilidade geral à infecção pelo *T. cruzi* do que o grupo WT/WT. Isto é evidenciado pela maior parasitemia e maior número de ninhos no fígado, coração e músculo estriado dos animais WT/KO. Este resultado apóia nossa hipótese de trabalho indicando que as células não leucocitárias contribuem ao controle do parasita pela sua resposta ao IFN γ .
- 2 Como esperado, os animais WT/KO são mais resistentes ao *T. cruzi* do que os animais IFN γ R-KO (KO).
- 3 Na 1ª experiência, os animais WT/KO mostram infiltrados inflamatórios menos intensos no músculo esquelético do que os animais WT/WT, enquanto que na 2ª experiência o mesmo é observado para o coração. Na 4ª experiência, entretanto, e tal vez por exibirem carga parasitária local intensa, os animais WT/KO mostram maior infiltração leucocitária cardíaca (e talvez muscular) do que os animais WT/WT. No seu conjunto, os dados são compatíveis com a hipótese das células não leucocitárias destes órgãos responderem ao IFN γ potenciando o recrutamento celular.
- 4 As diferenças na intensidade do infiltrado hepático entre os grupos WT/KO e WT/WT não são tão evidentes como nos outros órgãos.
- 5 Na análise individual dos animais WT/KO não encontramos correlação inversa importante entre o nível de reconstituição por células IFN γ R⁺ e a intensidade do parasitismo sistêmico e/ou tissular. Isto sugere que acima de um determinado nível a reconstituição não precisa ser completa para se tornar efetiva.
- 6 O modelo de quimera de medula óssea é adequado para verificar o envolvimento geral das células não leucocitárias na infecção pelo *T. cruzi*. Isto pode ser afirmado com certeza em relação ao fígado, órgão que é colonizado no início da infecção, mas não podemos concluir taxativamente seja adequado para o estudo do papel das células não leucocitárias no coração e músculo esquelético.
- 7 O achado dos grupos WT/WT e WT/KO exibirem diferente número de ninhos no coração e músculo estriado com pouca diferença na intensidade de infiltrado sugere que as células estruturais contribuem (pela sua

resposta ao IFN γ) ao recrutamento leucocitário nestes órgãos, contribuição que parece ter uma menor importância no fígado.

- 8 O modelo de infecção de quimeras WT/KO e WT/WT pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4 parece ser mais apropriado para o estudo da resposta ao IFN γ pelas células não leucocitárias do que o modelo de infecção por parasitas da cepa Y.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCANTARA, A.; BRENER, Z. The in vitro interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. **Acta Trop.**, v. 35, p. 209-219, 1978.

ANDRADE, Z. A. Mechanisms of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection. **Ciba Found. Symp.**, v. 9, p. 214-33, 1983.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G.; CORREA, R.; SADIGURSKY, M.; FERRANS, V. J. Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. **Am. J. Pathol.**, v.144, p. 1403-1411, 1994.

ANEZ, N.; CARRASCO, H.; PARADA, H.; CRISANTE, G.; ROJAS, A.; FUENMAYOR, C.; GONZALEZ, N.; PERCOCO, G.; BORGES, R.; GUEVARA, P.; RAMIREZ, J. L. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 60, n.5, p. 726-32, 1999.

BICE, D. E.; ZELEDON, R. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). **J. Parasitol.**, v. 56, p. 663–670, 1970.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 347–382, 1973.

BRENER, Z; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 114, p. 103–110, 1997.

BOSSIE, A.; VITETTA, E. S. IFN-gamma enhances secretion of IgG2a from IgG2a-committed LPS-stimulated murine B cells: implications for the role of IFN-gamma in class switching. **Cell Immunol.**, v. 135, p. 95-104, 1991.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudo sobre a morfologia e ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi*, N. Gen, N. sp., o agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.1, p. 159-218, 1909.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CAMPOS, M. A.; CLOSEL, M.; VALENTE, E. P.; CARDOSO, J. E.; AKIRA, S.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. **J. Immunol.**, v. 172, p. 1711-8, 2004.

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

CHANDRASEKAR, B.; MELBY, P.C.; TROYER, D.; COLSTON, J. T. FREEMAN, G. L. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. **Am. J. Pathol.**, v.152, n. 4, p. 925-34, 1998a.

CHANDRASEKAR, B.; MELBY, P. C.; PENNICA, D.; FREEMAN, G. L. Overexpression of cardiotrophin-1 and gp130 during experimental acute Chagasic cardiomyopathy. **Immunol. Lett.**, v. 61, n. 2-3, p. 89-95, 1998b.

COSTA, V. M.; TORRES, K. C.; MENDONCA, R. Z.; GRESSER, I.; GOLLOB, K. J.; ABRAHAMSOHN, I. A. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v. 177, p. 3193-200, 2006.

CUNHA-NETO, E.; COELHO, V.; GUILHERME, L.; FIORELLI, A.; STOLF, N.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. **J. Clin. Invest.**, v. 98, n.8, p. 1709-12, 1996.

DAY, Y.; HUANG, L.; YE, H.; LI, L.; LINDEN, J.; OKUSA, M. D. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: The role of CD4-T cells and IFN-1. **J. Immunol.**, v. 176, p. 3108–3114, 2006.

DIAS, J. C. The brazilian chagas' disease control programme in 1986. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 19, p. 129-33, 1986.

DIAS, E.; LARANJA, F.S.; MIRANDA, A.; NOBREGA, G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. **Circulation**, v. 14, n. 6, p.1035-1060, 1956.

ELIZARI, M. V. Chagasic myocardiopathy: historical perspective. **Medicina**, v. 59, p. 25-40, 1999. Supl. 2.

FICHERA, L. E.; ALBAREDA, M. C.; LAUCELLA, S. A.; POSTAN, M. Intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in cardiac myocytes is inhibited by cytokine-induced nitric oxide release. **Infect. Immun.**, v. 72, n.1, p. 359-63, 2004.

FUENMAYOR, C.; HIGUCHI, M. L.; CARRASCO, H.; PARADA, H.; GUTIERREZ, P.; AIELLO, V.; PALOMINO, S. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with T. cruzi parasitic antigens. **Acta Cardiol.**, v. 60, n. 1, p. 33-37, 2005.

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

GEDDES, M.; STOREK, J. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. **Best Pract. Res. Clin. Haematol.**, v. 20, n. 2, p. 329 e 348, 2007.

GUYRE, P. M.; MORGANELLI, P. M.; MILLER, R. Recombinant immune interferon increases immunoglobulin G Fc receptors on cultured human mononuclear phagocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 72, n. 1, p. 393-397, 1983.

HALL, B. S.; TAM, W.; RANJAN, S.; PEREIRA, M. E. A. Cell-specific activation of nuclear factor-kappaB by the parasite *Trypanosoma cruzi* promotes resistance to intracellular infection. **Mol. Biol. Cell.**, v. 11, n.1, p. 153-160, 2000.

HARDISON, J. L.; WRIGHTSMAN, R. A.; CARPENTER, P. M.; LANE, T. E.; MANNING, J. E. The chemokines CXCL9 and CXCL10 promote a protective immune response but do not contribute to cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 1, p. 125-34, 2006.

HUANG, H.; PETKOVA, S. B.; PESTELL, R. G.; BOUZAHZAH, B.; CHAN, J.; MAGAZINE, H.; WEISS, L. M.; CHRIST, G. J.; LISANTI, M. P.; DOUGLAS, S. A.; SHTUTIN, V.; HALONEN, S. K.; WITTNER, M.; TANOWITZ, H. B. *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas' disease) of mice causes activation of the mitogen-activated protein kinase cascade and expression of endothelin-1 in the myocardium. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 36, n. 5, p. S148-50, 2000. Suppl. 1.

ISAACS, J. D.; ANDREAS, T. Best Practice & research Clinical Haematology. **Immune Reconstitution**, v. 17, n. 2, p. 345-358, 2004.

MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C.; MESTRINER, F.L.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. et al., *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, v. 102, n.24, p. 3003-3008, 2000.

MACHADO, F. S.; KOYAMA, N. S.; CARREGARO, V.; FERREIRA, B. R.; MILANEZI, C. M.; TEIXEIRA, M. M.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Infect. Dis.**, v.191, p. 627-636, 2005.

MARINHO, C. R.; BUCCI, D. Z.; DAGLI, M. L.; BASTOS, K. R.; GRISOTTO, M. G.; SARDINHA, L. R.; BAPTISTA, C. R.; GONÇALVES, C. P.; LIMA, M. R.; ALVAREZ, J. M. 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.**, v. 72, p. 2350-2357, 2004.

MARINHO, C. R. F.; NUÑEZ, L. N.; MARTINS-SANTOS, R.; BASTOS K. R. B.; BOMBEIRO, A. L.; BUCCI, D. Z.; SARDINHA, L. R.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; ALVAREZ, J. M. IFN- γ , but not nitric oxide or specific IgG, is essential for the *in vivo* control of low-virulence Sylvio X10/4 *Trypanosoma cruzi* parasites. **Scand. J. Immunol.**, v. 66, p. 297-308, 2007.

MINOPRIO, P.; JOSKOWICZ, M. H. 36th Forum in Immunology, Chagas'disease: *Trypanosoma cruzi* vs the host immune system. **Res. Immunol.**, v. 142, p.137–167, 1991.

MINOPRIO, P. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches?. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, p. 588-591, 2001.

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

PALOMINO, S. A.; AIELLO, V. D.; HIGUCHI, M. L. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 94, p. 571- 579, 2000.

RIBEIRO, L. C.; BARBOSA, A.; ANDRADE, Z. A. Pathology of intracardiac nerves in experimental chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1019-1025, 2002.

RODRIGUEZ, A. M.; SANTORO, F.; AFCHAIN, I. D.; BAZIN, H.; CAPRON', A. *Trypanosoma cruzi* infection in B-cell-deficient rats. **Infect. Immun.**, v. 31, p. 524-9, 1981.

ROTTENBERG, M. E.; BAKHIET, M.; OLSSON, T.; KRISTENSSON, K.; MAK, T.; WIGZELL, H.; ORN'. A. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 5129-5133, 1993.

RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; GARIBALDI, M. C. M.; MINOPRIO, P.; HONTEYBERIE-JOSKOWICZ, M. The influence of T cell subsets on *Trypanosoma cruzi* multiplication in different organs. **Immunol. Lett.**, v. 49, n. 3, p. 163-168, 1996.

SANA, T. R.; JANATPOUR, M. J.; SATHE, M.; MCEVOY, L. M.; MCCLANAHAN, T. K. Microarray analysis of primary endothelial cells challenged with different inflammatory and immune cytokines. **Cytokine**, v. 29, p. 256-269, 2005.

SARDINHA, L. R.; ELIAS, R. M.; MOSCA, T.; BASTOS, K. R. B.; MARINHO, C. R. F.; D'IMPÉRIO, L. M. R.; ÁLVAREZ, J. M. Contribution of NK, NK T, gammadelta T, and alphabeta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 4, p. 2031-2042, 2006.

SCHRODER, K.; LICHTINGER, M.; IRVINE, K. M.; BRION, K.; TRIEU, A.; ROSS, I. L.; RAVASI, T.; STACEY, K. J.; REHLI, M.; HUME, D. A.; SWEET, M. J. PU.1 and ICSBP control constitutive and IFN-gamma-regulated Tlr9 gene expression in mouse macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, v. 81, p. 1577– 1590, 2007.

SEBASTIAN, E. B. G. Genes from Chagas Susceptibility Loci That Are Differentially Expressed in *T. cruzi*-Resistant Mice Are Candidates Accounting for Impaired Immunity. **Genes Immun.**, v. 4, p. 321–325, 2003.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWIEG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clin. Biol.**, v. 20, p. 191-203, 1953.

SILVEIRA, F.; DIAS, V. M.; SILVEIRA, F. T.; DIAS, M. G. V.; PARDAL, P. P.; LOBÃO, A. O.; MELO, G. B. Nono caso autóctone de doença de Chagas registrado no estado do Pará, Brasil. **Hiléia Med.**, v. 1, p. 61-62, 1979.

TALVANI, A.; RIBEIRO, C. S.; ALIBERTI, J. C. S.; MICHAILOWSKY, V.; SANTOS, P. V. A.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; ALMEIDA, I. C.; FARBER, J.;

LANNES-VIEIRA, J.; SILVA, J. S.; GAZZINELLI, R. T. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN- γ as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infect.**, v. 2, n. 8, p. 851-866, 2000.

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

TARLETON, R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, p. 550-554, 2001.

UMEKITA, L. F.; MOTA, I. How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 253-258, 2000.

VAENA DE AVALOS, S. G.; BLADER, I. J.; FISHER, M. L.; BOOTHROYD, J. C.; BURLEIGH, B. A. Immediate/early response to *Trypanosoma cruzi* infection involves minimal modulation of host cell transcription. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 1, p. 639-644, 2002.

VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; REIS, D. D.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. **Lancet**, v. 348, p. 891-892, 1996.

VAN VOORHIS, W. C.; EISEN, H. *FL-160*. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. **J. Exp. Med.**, v. 169, p. 641-52, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the Scientific Working Group on Chagas Disease Buenos Aires**, p. 17-20, Apr. 2005.

ZHAO, D. X., HU, Y.; MILLER, G.; LUSTER, A. D.; MITCHELL, R. N.; LIBBY, P. Differential expression of the IFN-gamma-inducible CXCR3-binding chemokines, IFN-inducible protein 10, monokine induced by IFN, and IFN-inducible T cell alpha chemoattractant in human cardiac allografts: association with cardiac allograft vasculopathy and acute rejection. **J. Immunol.**, v. 169, n. 3, p. 1556-1560, 2002.

ANEXO A

3ª EXPERIÊNCIA: Avaliação do estado quimérico (excluídos os animais que apresentaram baixa percentagem de reconstituição)

Os animais da 3ª experiência foram re-analisados excluindo os camundongos WT/KO com baixas percentagens de reconstituição. A exclusão destes animais, entretanto, não alterou a significância mostrada na análise anterior para ninhos e infiltrados nos diferentes órgãos (que tinha sido realizada com a totalidade dos animais).

Figura A.1 - Frequência de células IFN γ R⁺ nas populações de células CD3⁺ e B220⁺ nos camundongos da 3ª experiência, excluídos os animais que apresentaram baixa percentagem de reconstituição. Vinte quatro semanas após a transferência de medula óssea foi analisada a frequência de células IFN γ R⁺ nas populações de células CD3⁺ e B220⁺ do sangue periférico, de animais WT/WT, WT/KO, WT e KO (3ª experiência). *** p<0,001.

O grupo WT/KO com formado por 13 animais, apresentou diferença estatística com $p < 0,001$, se comparado frente ao grupo WT/WT (Figura 1).

A porcentagem de células $\text{IFN}\gamma\text{R}^+$ dos animais WT/KO foi maior nas células CD3^+ do que nas células B220^+ .

Figura A.2 - Percentagem de reconstituição de células CD3^+ $\text{IFN}\gamma\text{R}^+$ e B220^+ $\text{IFN}\gamma\text{R}^+$ da 3ª experiência, excluindo os animais que apresentaram baixa percentagem de reconstituição respeito às duas populações. Vinte quatro semanas após a transferência de medula óssea foi analisada a percentagem de reconstituição, no sangue de animais quiméricos e controles (3ª experiência). A. Expressão de $\text{IFN}\gamma\text{R}$ em células CD3^+ . B. Expressão de $\text{IFN}\gamma\text{R}$ em células B220^+ .

O 38% dos animais do grupo WT/KO mostra percentagens de reconstituição acima da média (45% e 40%) do grupo para as populações CD3^+ e B220^+ , respectivamente (Figura 2).

ANEXO B

3ª EXPERIÊNCIA: Avaliação da infecção pelo *T. cruzi* (excluídos os animais com baixa percentagem de reconstituição)

Figura B.1 - Análise comparativa da carga parasitaria em camundongos dos grupos controle negativo (IFN γ R-KO), controle positivo (C57BL/6), quimera WT/WT e quimera WT/KO da 3ª experiência, excluindo os animais que apresentaram baixa percentagem de reconstituição. Os animais foram infectados com 10⁵ tripomastigotas da cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi* e as parasitemias analisadas em diferentes dias da infecção. Os números na figura indicam o número de animais positivos do total de animais do grupo. Existem diferenças estatísticas nos dias 25, 27, 29 e 31 p.i entre WT/WT e WT/KO, $p < 0,05$.

Houve diferenças estatísticas entre WT/WT vs WT/KO, no dia 25 p.i. ($p < 0,05$), nos dias 27, 29 p.i. ($p < 0,005$) e no dia 31 p.i. ($p < 0,001$).

Figura B.2 - Correlação entre o nível de reconstituição e número de parasitas circulantes no sangue de animais WT/KO da 3^a experiência, excluindo os animais que apresentaram baixa percentagem de reconstituição. O valor da carga parasitária apresentado é a média dos valores de parasitemias a partir do dia de posituação (dia 20 p.i.) até o primeiro dia do sacrifício dos animais (dia 27 p.i.). A. Correlação respeito às células CD3⁺. B. Correlação respeito às células B220⁺.

Como citado nos resultados da tese, a análise histopatológica da experiência 3 é mais reduzida que as análises de reconstituição e parasitemia, devido à perda acidental dos blocos de histologia.

Figura B.3- Análise comparativa do número de ninhos e infiltrados inflamatórios presentes no coração dos animais da 3ª experiência, excluindo os animais que apresentaram baixa percentagem de reconstituição. Animais sacrificados nos dias 27 p.i. (grupo controle negativo KO, grupo quimera WT/WT e grupo quimera WT/KO) e 29 p.i. (grupos quimera WT/WT e quimera WT/KO). A. Número de ninhos no coração. B. Nível de miocardite. Infecção com 10^5 tripomastigotas da cepa Sylvio 10X/4 de *T. cruzi*. Intensidade do infiltrado: (0) nenhum infiltrado, (1) 1 - 10 infiltrados, (2) 11 - 20 infiltrados, (3) 21 - 30 infiltrados e (4) mais de 31 infiltrados. Existem diferenças estatísticas entre WT/WT e WT/KO, respeito ao número de ninhos presentes no coração nos dias 27 e 29 p.i. ** $p < 0,005$.

Figura B.4 - Análise comparativa entre número de ninhos e número de infiltrados inflamatórios no coração dos animais da 3ª experiência, excluindo os animais que apresentaram baixa percentagem de reconstituição. Infecção com 10^5 tripomastigotas da cepa Sylvio 10X/4 de *T. cruzi*. A. Animais sacrificados no dia 27 p.i., grupo KO (5 animais), WT/WT (4 animais) e WT/KO (4 animais). B. Animais sacrificados no dia 29 p.i., grupo WT/WT (5 animais) e WT/KO (4 animais). Intensidade do infiltrado: (0) nenhum infiltrado, (1) 1 - 10 infiltrados, (2) 11 - 20 infiltrados, (3) 21 - 30 infiltrados e (4) mais de 31 infiltrados.

Figura B.5 - Análise comparativa do número de ninhos e infiltrados inflamatórios presentes no fígado dos animais da 3ª experiência, excluindo os animais que apresentaram baixa percentagem de reconstituição. Animais sacrificados nos dias 27 p.i., grupo KO (5 animais), WT/WT (4 animais) e WT/KO (4 animais). Animais sacrificados no dia 29 p.i., grupo WT/WT (5 animais) e WT/KO (4 animais). Intensidade do infiltrado: (0) nenhum infiltrado, (1) 1 - 10 infiltrados, (2) 11 - 20 infiltrados, (3) 21 - 30 infiltrados e (4) mais de 31 infiltrados. A. Número de ninhos no fígado. Não houve diferenças estatísticas entre WT/WT vs WT/KO. B. Nível de hepatite. Há diferenças estatísticas entre WT/WT vs WT/KO, nos dias 27 e 29 p.i. respectivamente. ** $p < 0,005$. *** $p < 0,0001$.

Figura B.6 - Análise comparativa do número de ninhos e infiltrados inflamatórios presentes no músculo estriado esquelético nos animais da 3ª experiência, excluindo os animais que apresentaram baixa percentagem de reconstituição. Animais sacrificados no dia 27 p.i., grupo KO (5 animais), WT/WT (4 animais) e WT/KO (4 animais). Animais sacrificados no dia 29 p.i., grupo WT/WT (5 animais) e WT/KO (4 animais). Infecção com 10^5 tripomastigotas da cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi*. A. Número de ninhos no músculo: existem diferenças estatísticas entre WT/WT vs WT/KO no dia 29, com $*p < 0,05$. B. Nível de miosite. Intensidade do infiltrado: (0) nenhum infiltrado, (1) 1 - 10 infiltrados, (2) 11 - 20 infiltrados, (3) 21 - 30 infiltrados e (4) mais de 31 infiltrados. Não existem diferenças estatísticas entre WT/WT vs WT/KO.

ANEXO C. Tabela de comparação das diferenças estatísticas observadas na 1ª e 2ª análise da 3ª experiência. Quimeras em fundo C57BL/6. Infecção com T. cruzi da cepa Sylvio X10/4.

Diferenças	Análise do quimerismo		PARASITEMIA			Patologia											
			dias			27						29					
	% CD3 IFN γ R+	%B220 IFN γ R+	25	27	29	coração		fígado		músculo estriado		coração		fígado		músculo estriado	
						infiltrado	ninhos	infiltrado	ninhos	infiltrado	ninhos	infiltrado	ninhos	infiltrado	ninhos	infiltrado	ninhos
WT/WT vs WT/KO	p<0.001	p<0.001	P< 0.05	P<0.005	P<0.05	ns	P<0.005	P<0.001	ns	ns	ns	ns	P<0.001	P<0.005	ns	ns	p<0.05
1ª Análise																	
WT/WT vs WT/KO	p<0.001	p<0.001	P< 0.05	P< 0.005	P< 0.005	ns	p< 0.005	p< 0.005	ns	ns	ns	ns	p< 0.005	p< 0.0001	ns	ns	p=0.07
2ª Análise																	