ADRIANA MONTE CASSIANO CANAVACI

**Papel dos Leucotrienos durante a infecção experimental de
camundongos com *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Auro Nomizo

RIBEIRÃO PRETO

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Canavaci, Adriana Monte Cassiano.

Papel dos Leucotrienos durante a infecção experimental de
camundongos com *Trypanosoma cruzi* / Adriana Monte Cassiano
Canavaci; orientador Auro Nomizo.- Ribeirão Preto, 2007.
131 p. il.; 30 cm

Tese de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia, Área de concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Leucotrienos. 3. Imunorregulação.

Sumário

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	i
Lista de figuras.....	iv
Lista de tabelas.....	vi
Resumo.....	viii
Abstract.....	x
1. Introdução.....	1
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.2. Doença de Chagas.....	3
1.3. Relação parasito-hospedeiro.....	5
1.4. A resposta imune e <i>T. cruzi</i>	6
1.5. Mediadores lipídicos.....	21
1.5.1. Mediadores lipídicos durante a infecção.....	25
2. Objetivos.....	29
2.1. Objetivos gerais.....	30
2.2. Objetivos específicos.....	30
3. Material e Métodos.....	31
3.1. Animais.....	32
3.2. Infecção.....	32
3.3. Parasitemia e Mortalidade.....	32
3.4. Histopatologia.....	32
3.5. Dosagem de NO _x (NO ₂ /NO ₃).....	33
3.6. Obtenção de células da cavidade peritoneal e obtenção dos sobrenadantes para dosagem dos leucotrienos.....	33
3.7. Dosagem de leucotrienos.....	34
3.8. Obtenção de células esplênicas.....	34
3.9. Obtenção de sobrenadantes de cultura celular.....	34
3.10. Quantificação de citocinas por ELISA.....	35
3.11. Análise fenotípica das populações celulares por citofluorimetria de Fluxo.....	36
3.12. Obtenção de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	36
3.13. Avaliação da adesão/invasão de tripomastigotas e atividade tripanocida de	

células peritoneais aderentes.....	37
3.13.1. Avaliação da adesão/invasão de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	37
3.13.2. Capacidade tripanocida dos macrófagos peritoneais.....	38
3.14. Produção de antígenos de <i>T. cruzi</i>	38
3.15. Determinação de anticorpos específicos contra <i>T. cruzi</i>	38
3.16. Análises estatísticas.....	39
4. Resultados.....	40
4.1. Quantificação de Prostaglandinas e Leucotrienos produzidas por células do lavado peritoneal de camundongos 129 e camundongos 129 5-LOko infectados com cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i>	41
4.2. Avaliação do número de parasitas circulantes (parasitemia) em camundongos 129 e camundongos 129 5-LOko infectados com cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i>	42
4.3. Avaliação da sobrevivência camundongos 129 e camundongos 129 5-LOko durante a fase aguda de infecção pelo <i>T. cruzi</i>	43
4.4. Histopatologia do coração, músculo esquelético e fígado de camundongos 129 e 129 5-LOko infectados com <i>T. cruzi</i>	44
4.5. Quantificação de citocinas produzidas por células esplênicas de camundongos 129 e 5-LOko infectados com <i>T. cruzi</i>	50
4.6. Análise do fenótipo de células T do baço provenientes de camundongos 129 e 5-LOko infectados com <i>T. cruzi</i>	53
4.7. Análise do fenótipo de diferentes populações celulares do baço provenientes de camundongos 129 e 129 5-LOko infectados com <i>T. cruzi</i>	56
4.8. Quantificação dos níveis séricos de NO ₃ e NO ₂ (produtos de oxidação do óxido nítrico – NO) em camundongos 129 e 129 5-LOko infectados por <i>T. cruzi</i>	60
4.9. Análise dos níveis séricos de anticorpos específicos para <i>T. cruzi</i> em camundongos 129 e 129 5-LOko infectados.....	61
4.10. Avaliação da capacidade de Adesão/invasão (Aderidos e intracelulares) do <i>T. cruzi</i> e atividade tripanocida de macrófagos peritoneais de camundongos 129 e 129 5-LOko.....	63

5. Discussão.....	65
5.1. Citocinas e Mediadores lipídicos na infecção.....	66
5.2. Perfil de células esplênicas durante a fase aguda de infecção pelo <i>T. cruzi</i>	77
5.3. Interação e Atividade Tripanocida de Macrófagos.....	87
6. Conclusões.....	97
7. Referências Bibliográficas.....	100
8. Anexos.....	129

Lista de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

5-LO	5-lipoxigenase
A23187	Código de registro para ionóforo de cálcio
AACOCF3	inibidor de cPLA ₂
BLT1	Receptor de LTB ₄
CCR_	Chemokine Receptor (receptor de quimiocina)
CD_	Cluster of Differentiation_
COX	cicloxygenase
CP-105,696	Antagonista do receptor de LTB ₄
cPLA2	Cytosolic phospholipase A2
CysLTs	Cysteinyl Leukotrienes (cisteinil leucotrienos)
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
F4/80	Marcador de superfície celular
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluorescein isotiocianate (isotiocianato de fluoresceína)
FLAP	Five-lipoxigenase-activating protein
GR-1	Marcador de superfície celular Ly-6G
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HETEs	Hidroxieicosanóides
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule (molécula de adesão intercelular)
IFN- γ	Interferon gamma
IFN- α/β	Interferon alpha/beta
IgG_	Imunoglobulina G _
IL-	Interleucina-
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase (Óxido Nítrico Sintase induzível)
LOX	lipoxigenase
LPS	lipopolissacaride
LT_	Leucotrieno_
LTs	Leucotrienos
LX_	Lipoxina_

Ly-6C	Marcador de superfície celular GR-1
mAbs	monoclonal Antibodies (anticorpos monoclonais)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
MK886	Inibidor de FLAP
mRNA	messenger Ribonucleic acid (ácido ribonucléico mensageiro)
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced form (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida)
NF- κ B	Fator de transcrição
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T
NO	Nitric Oxide (óxido nítrico)
NO _x	Nitric Oxide x (óxido nítrico x) = NO ₂ e NO ₃
OPD	Ortofenilenodiamino
PAF	Platelet-Activating Factor (fator ativador de plaqueta)
PBS	Phosphate Buffered Saline (salina fosfato-tamponada)
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da DNA Polimerase)
PE	r-phicoeritrin (ficoeritrina)
PerCP	Peridinin Chlorofil Protein (proteína peridinina clorofil)
PG	Prostaglandina
PGs	Prostaglandinas
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLIP	cPLA2-interacting protein
RPMI	Meio de cultura celular
SBF	Soro Bovino Fetal
SPF	Species Pathogen Free
SRS-A	Slow Reacting Substances of Anaphylaxis
Th	T helper
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
TX	tromboxano

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Formação dos mediadores lipídicos a partir de fosfolipídios de membrana.....	23
Figura 2.	Dosagem de LTB ₄ , PGE ₂ e LTC ₄ produzidas por células do lavado peritoneal de animais infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
Figura 3.	Curva de parasitemia em camundongos 129 e 5-LOko infectados com a cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
Figura 4.	Porcentagem de sobrevivência de camundongos 129 e camundongos 129 5-LOko infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
Figura 5.	Cortes histológicos do coração de camundongos após 16 dias de infecção.....	45
Figura 6.	Cortes histológicos do músculo esquelético de camundongos após 16 dias de infecção.....	46
Figura 7.	Cortes histológicos do fígado de camundongos após 16 dias de infecção.	47
Figura 8.	Cortes histológicos do coração de camundongos após 19 dias de infecção.....	49
Figura 9.	Níveis de citocinas em sobrenadantes de cultura de esplenócitos provenientes dos diferentes grupos experimentais ao longo da fase aguda de infecção.....	52
Figura 10.	Fenótipo de células T esplênicas provenientes de animais infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	55
Figura 11.	Análise da população de células T regulatórias (Treg) no baço de animais infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	56
Figura 12.	Análise fenotípica de diferentes populações celulares esplênicas provenientes dos diferentes grupos experimentais.....	59
Figura 13.	Níveis séricos de NOx em camundongos infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
Figura 14.	Níveis séricos de anticorpos específicos para o parasita da classe IgG em camundongos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
Figura 15.	Avaliação da adesão/invasão do parasita e da atividade tripanocida de células peritoneais aderentes.....	64

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Determinação do número de ninhos de amastigotas em coração, fígado e músculo esquelético de animais 129 e 5-LO ^{-/-} infectados com a Cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i>	48
---	----

Resumo

CANAVACI, A. M. C. **Papel dos Leucotrienos durante a infecção experimental de camundongos com *Trypanosoma cruzi*.** 2007. 131 F. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

No presente trabalho verificamos o papel dos Leucotrienos na modulação da resposta imune durante a fase aguda da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*, usando como modelo camundongos deficientes da enzima 5-lipoxigenase (5-LOko). Os nossos dados demonstram que camundongos infectados pelo *T. cruzi* produzem metabólitos do ácido aracdônico como PGE₂, LTB₄ e LTC₄. Comparados aos animais controles, os animais 5-LOko apresenta parasitemia mais tardia e menor, tem menor parasitismo tissular, menor infiltrado de células inflamatórias no coração e musculatura esquelética e apresenta menor taxa de mortalidade durante a fase aguda, indicando que animais deficientes de leucotrienos são mais resistentes a infecção pelo parasito. Animais 5-LOko está relacionado com a manutenção de números elevados de células F4/80⁺ e redução de células CD11b⁺ durante a infecção e menor número de células T ativadas expressando os marcadores CD4⁺CD69⁺, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD44⁺ e CD8⁺CD69⁺, números inalterados de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺GITR⁺ e menor produção de anticorpos parasito-específicos do isotipo IgG2a. O controle eficiente de parasitas por animais 5-LOko está associado ao aumento de células Gr-1⁺ e CD11c⁺GR-1⁺, produção aumentada IL-12, IFN-γ, e produzirem menos PGE₂, IL-10, ao contrario, animais controles, incapazes de controlar parasitas circulantes, produzem mais PGE₂ e IL-10 e menos IL-12 e IFN-γ. A baixa mortalidade de animais 5-LOko correlaciona com a produção de PGE₂ e IL-10, produzir muita IL-12 e menos IFN-γ e NO e baixíssima parasitemia. A mortalidade maior de animais controles envolve a produção IFN-γ e altos níveis de LTB₄, LTC₄, NO e ausência de IL-10, IL-1β, PGE₂ e números elevados de parasitas circulantes. Ainda macrófagos de animais 5-LOko apresentam maior capacidade de adesão/internalização de tripomastigotas e alta atividade tripanocida por mecanismo independente da geração de NO. Estes dados em conjunto demonstram que mediadores lipídicos produzidos pela enzima 5-lipoxigenase como LTB₄ e LTC₄ modulam negativamente a capacidade dos camundongos para geração de uma resposta imune capaz de controlar os parasitos durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

Abstract

CANAVACI, A. M. C. **The role of 5-lipoxygenase-derived lipid mediators during the experimental *Trypanosoma cruzi* infection in mice.** 2007. 131 F. Thesis (Master)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Accumulating studies have indicated that 5-lipoxygenase (5-LO) converted lipid mediators as leukotrienes acts modulating the host immune response against infectious diseases. The precise role of leukotrienes during the protozoan infection is unknown. In this work we evaluate the role of leukotrienes during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection using as model the 5-lipoxygenase deficient mice (5-LOko). Our results show that PGE₂, LTB₄ and LTC₄ are produced during the *Trypanosoma cruzi* infection. 5-LOko infected mice are more resistant than control mice as judge by the lower parasitemia, decreased number of parasite nest and inflammatory cells in the heart and skeletal muscle and low rate of mortality. The resistance of 5-LOko mice is associated with the increased capacity of spleen cells to produce cytokines as IL-12 and IFN- γ ; sustained capacity to produce detectable levels of IL-10 and PGE_e and low NO serum levels than control mice. In contrast, the wild type mice are extremely susceptible and are unable to control parasites efficiently. The susceptibility is associated with increased levels of IL-10 and PGE₂ and low IL-12 and IFN- γ production. The high mortality rate in wild type mice is related with high LTB₄, LTC₄ and NO levels and bias to produce only type 1 cytokines. Also we shown that resistant 5-LOko mice present increased number of spleen cells expressing GR-1⁺, GR-1⁺CD11c⁺, F4/80⁺ and lower numbers o spleen cells expressing CD4⁺CD69⁺, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD44⁺, CD8⁺CD69⁺ and CD11b⁺ and low serum levels of parasite-specific IgG2a than wild type mice and do not present alteration in T_{REG} expressing CD4⁺CD25⁺GITR⁺. Importantly, IFN- γ and- LPS activated macrophage from 5-LOko mice but not from wild type mice, present high capacity to recognize typomastigotes, internalize them and strong capacity to kill intracellular parasite as NO independent pathway. The results implicate that high levels leukotrienes, NO and pure type 1 cytokines production is associated to susceptibility to parasite. In contrast, leukotrienes deficiency led to an balanced immune response with relative high levels of type 1 cytokines and relative low levels of NO, type 2 cytokines and PGE₂ that efficiently control the parasites. Also indicate that 5-lipoxygenase converted lipid mediators contribute negatively to generation of an effective immune response during the acute phase of *T. cruzi* infection.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Trypanosoma cruzi*

É conhecida a existência de muitas espécies de protozoários, e diversos gêneros desta espécie são capazes de infectar uma variedade de seres vertebrados. As doenças causadas por protozoários são de grande relevância na medicina humana e veterinária, principalmente porque ainda são endêmicas em diversos países de clima tropical e subtropical, bem como, porque paciente infectado imunossuprimido apresentam uma reagudização da doença e é um dos fatores negativos para prognóstico destes pacientes. Em humanos, os principais gêneros de protozoários causadores de doenças são Plasmodium, Toxoplasma, Leishmania e Trypanosoma.

Os parasitas dos gêneros Trypanosoma e Leishmania são protozoários da ordem Kinetoplastida (HERWALDT, 1999). Dentre as diversas espécies de Trypanosoma, duas são muito relevantes por causar doença em seres humanos: *Trypanosoma brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense*, que no continente africano é transmitido pela picada da mosca Tse-Tse, causando a Doença do Sono ou Tripanossomíase Africana (revisto por COX, 2003); e *Trypanosoma cruzi*, transmitido pela picada de determinados triatomíneos é causador da Doença de Chagas no continente americano (revisto por PERLETH, 1997). Estima-se que aproximadamente 16-18 milhões de pessoas na América do Sul estão infectadas por *T. cruzi*, parasita causador da doença de Chagas, e outros 90 milhões correm risco de serem infectadas (WHO, 2002). No Brasil, a prevalência é de aproximadamente 4%, o que corresponde cerca de seis milhões de pessoas (HIGUCHI et al., 2003).

T. cruzi poderia ser classificado seguindo critérios morfológicos e de tropismo celular. Assim, as cepas finas, como Cepa Y, seriam reticulotrópicas, por seu tropismo preferencial por células hematopoiéticas e fibroblastos e as cepas largas, como Cepa CL, Brazil, Tulahuen e Colombiana são consideradas miotrópicas, por seu tropismo preferencial por células musculares cardíacas e esqueléticas (MELO & BRENER, 1978; ANDRADE, 1985).

Os critérios morfológicos/tropismo para as distinções dessas cepas também correlaciona com a presença de marcadores moleculares que as distinguem, presentes no cinetoplasto do parasita (MOREL et al., 1980). Embora esses critérios sejam relevantes para o curso da infecção, virulência e manifestação da imunopatologia, com a evolução da doença, ambas, infectariam células de nichos semelhantes, como linfonodos, baço, músculos e trato-gastrointestinal

(CORDEIRO et al., 1996). Posteriormente, baseado em estudos sobre a taxonomia dos parasitos pela presença ou ausência de diferentes isoenzimas denominadas Zimodemas (MILES et al., 1980), Fernandes e cols. (1998) demonstraram que, molecularmente, *T. cruzi* poderia ser classificados como Tipo I e Tipo II. O Tipo II é predominante no ciclo domestico, portanto, relacionados com a infecção em humanos (ZINGALES et al., 1999) e o Tipo I é o mais encontrado com ciclo silvestre (CLARK & PUNGE, 1994). Posteriormente, através de ensaios sorológicos em soros de pacientes infectados utilizando como antígeno uma proteína mucina-like ancorada em glicosil-fosfatidil-inositol (TSSA I e TSSA II) do parasito e comparando com anticorpos gerados pela infecção experimental com parasita sabidamente Tipo I e Tipo II, foi demonstrado que a reatividade dos soros de pacientes humanos para TSSA II correlacionam com *T. cruzi* do Tipo II (DI NOIA et al., 2002).

1.2. Doença de Chagas

A Doença de Chagas pode apresentar diversos tipos de manifestações clínicas, que geralmente correlacionam com a fase da infecção. Assim, no início da infecção ou Fase Aguda (3 a 4 meses) é caracterizada pela parasitemia ou presença de formas circulantes (tripomastigotas). A presença de parasitas circulantes pode ser detectada por xenodiagnóstico, hemocultura (Brener, 1980) e pela caracterização molecular do parasita no sangue pela técnica de PCR (GUHL et al., 2002).

Em adultos, a fase aguda, na maioria dos casos parece ser assintomática ou mesmo levar a apresentação de sintomas não específicos, comumente encontrados em outras doenças como febre, cansaço, letargia e linfocitose que dificultam o diagnóstico da doença. Os sinais clínicos mais relacionados à infecção são: reação inflamatória local com formação de forte edema no local de entrada do parasita (chagoma de inoculação ou sinal de Romana (edema palpebral), febre, esplenomegalia e arritmias cardíacas e são mais evidentes principalmente em crianças (revisto em BARRET et al., 2003). Em biopsias do coração, foi verificado que a fase aguda apresenta alterações histopatológicas, que, incluem a presença de intenso infiltrado inflamatório predominantemente de células mononucleares, presença de ninhos (contendo formas amastigotas) e menos frequentemente pequenas áreas de necrose focal do miocárdio. Em menos de 1-5% dos casos, os pacientes podem manifestar problemas neurológicos e/ou complicações cardíacas graves que às vezes podem levá-los a óbito (ANSELMi & MOLEIRO, 1972; PRATA, 2001).

Após a fase aguda, a doença é caracterizada pela ausência de manifestações clínicas e raramente são encontrados parasitas circulantes. As alterações histológicas também reduzem ou desaparecem. Esta fase da doença é denominada Indeterminada ou Crônica Assintomática. O diagnóstico da doença nesta fase é possível através do exame sorológico para detecção de anticorpos específicos para o parasito da classe IgM (fase aguda) e IgG (fase indeterminada e crônica) (revisto em UMEZAWA et al., 2004). A fase indeterminada pode persistir por toda a vida do indivíduo e é nela que se encontra o maior número de pessoas infectadas (70-85%) (PRATA, 2001; BARRET et al., 2003).

Entretanto em aproximadamente 15-30% dos pacientes infectados, a doença pode progredir para a fase Crônica Sintomática ou Ativa, evidenciada geralmente após 10-25 anos de infecção, é caracterizada pela ausência de parasitas circulantes, presença ou ausência de formas amastigotas nos tecidos, presença de inflamação e lesão tissular em determinados órgãos infectados como coração ou trato digestivo, levando a manifestações clínicas polarizadas. Assim, a forma cardíaca é caracterizada por disfunções como: arritmias, miocardite não degenerativa, cardíomegalia, insuficiência cardíaca congestiva e morte súbita (BRENER & ANDRADE, 1987; TANOWITZ, 1992); e a forma digestiva é caracterizada por apresentar um aumento de no tamanho do esôfago (megaesôfago) e/ou cólon (megacólon) (EARLAM, 1972; LOPES et al., 1989; ADAD et al., 1991).

A inflamação, no coração e no trato digestivo, é caracterizada pela presença de infiltrado celular focal, predominantemente composto por linfócitos e macrófagos (BRENER, 1992, TALVANI et al., 2002). As cardiopatias chagásicas têm sido correlacionadas com a presença de lesão progressiva nas inervações autonômicas, alterações microvasculares e deformações na matrix extracelular (HIGUCHI et al., 2003). As disfunções na forma digestiva da Doença de Chagas também têm sido relacionadas à destruição progressiva das inervações no esôfago e cólon (KÖEBERLE, 1968; ADAD et al., 1991). Estes dados demonstram que a reação inflamatória local seria responsável pelas disfunções nestes órgãos.

A Doença de Chagas é ainda uma doença incurável em humanos, pois, a resposta imune consegue apenas controlar o número de parasitas, sendo incapaz de eliminá-lo. Até o momento, há uma quimioterapia específica, em que apenas duas drogas são parcialmente eficazes contra o parasita: o Nifurtimox e o Benzonidazol (revisto por URBINA et al., 2002; CERECETTO & GONZALEZ, 2002). A eficácia do tratamento é maior quando estas drogas são administradas

logo após a infecção, pois parecem ser menos ativas em estágios avançados da doença (CANÇADO, 1985). Mais ainda, são tóxicas e podem induzir resistência nos parasitas e determinadas cepas apresentam alta refratariedade ao tratamento (CERECETTO & GONZALEZ, 2002).

1.3. Relação parasito-hospedeiro

Tem sido bem documentado que a evolução da infecção natural ou experimental por *T. cruzi*, bem como, a geração de um padrão de resposta imune dirigido pelo parasita está associado a fatores como a via ou forma de contágio (BIJOVSKY et al., 1984; BAHIA et al., 2002; HOFT & ECKIHOFF, 2002); associados à espécie de hospedeiro (DO PRADO et al., 1999; DOST et al., 2002), com a variabilidade genética intra-espécie (ROWLAND & KUHN, 1978; RIVERA-VANDERPAS et al., 1983; ANDRADE et al., 1985), a idade (CARDILLO et al., 1993), ao dimorfismo sexual (CHAPMAN et al., 1975; DO PRADO et al., 1998) e estatus imunológico (FERREIRA & BORGES, 2002); e fatores associados ao parasita como a variabilidade das cepas (HAUSCHKA, 1949; HAUSCHKA & GOODWIN, 1950; DVORAK, 1984); origem da forma infectante (NEAL & MCHARDY, 1977; NOGUEIRA, 1983), forma e tropismo tissular (BRENER & CHIARI, 1963; MELO & BRENER, 1978; ANDRADE, 1985), variabilidade antigênica durante a infecção (NUSSENZWEIG et al., 1962) e fatores de virulência (WESTON et al., 1999; PEREZ-BRANDAN et al., 2006).

O camundongo tem sido um modelo de escolha (guardada pontuais diferenças com a infecção em humanos) para estudar a infecção por diversos patógenos como, bactérias, fungos, vírus, helmintos e protozoários, pois grande parte dos conhecimentos hoje existentes sobre a ontogenia, fisiologia e distinções do sistema imune foram, e estão sendo obtidos em camundongos. Adicionalmente, o camundongo é um animal de experimentação no qual foi realizada a maioria das manipulações genéticas *in vivo*, que tem propiciado a geração de espécies mutantes deficientes em um ou mais genes “knockouts (Ko)”; que expressam múltiplas cópias de um determinado gene “transgênicos (Tg)” ou animais Tg ou Ko que apresentam a modulação do gene pontualmente ou temporalmente em um órgão ou tecido.

1.4. A resposta imune e *T. cruzi*

Durante o processo infeccioso, se espera que o sistema imunológico seja eficiente para destruir o patógeno, mas não as células e tecidos do hospedeiro. No caso específico da Doença de Chagas, há uma resposta imune com um padrão complexo e potente capaz de controlar, durante a fase aguda, eficientemente formas parasitárias circulantes e tissulares (intracelulares). No entanto, a excessiva quantidade de mediadores pró-inflamatórios, parece propiciar a quebra de tolerância de células auto-reativa e induzir manifestações sistêmicas como anemia, caquexia, alterações hemodinâmicas e estresse oxidativo, que induz danos tissulares, apoptose e, até mesmo, a morte do hospedeiro. A apoptose associada à produção de mecanismos compensatórios como mediadores antiinflamatórios levam a uma imunossupressão temporária, permitindo que o parasita persista, levando à cronificação da doença. Da mesma forma, a impossibilidade de geração de uma resposta eficiente ou a geração de uma resposta imune inadequada, torna o hospedeiro susceptível à doença, favorecendo a disseminação do parasita e morte do hospedeiro.

Portanto, as investigações imunológicas em Doença de Chagas e outras patologias nos dias de hoje buscam melhor compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na resposta ao parasita, tornando possível o desenvolvimento de vacinas que levem a geração de uma resposta imune eficiente e “equilibrada” ou mesmo formas de se intervir terapêuticamente para minimizar as imunopatologia e seqüelas advindas dos fatores de virulência do parasito (BACHMANN & KOPF, 2002),

Recentemente na tentativa de entender o que ocorreria logo após a penetração do parasita no tecido e utilizando a técnica de cDNA array para ~27.000 genes, foi avaliada a modulação (aumento ou repressão) de genes expressos em fibroblastos controles e infectados com *T. cruzi*. As análises demonstraram que nas primeiras 2-6 horas pós infecção (p.i), ocorre, em células infectadas, repressão de genes para indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), capaz de matar parasitas intracelulares (NAGINENI et al., 1996), bem como, para proteínas que fazem a interação das células com componentes da matriz extracelular como *CTGF*, *Cyr61* e *ADAMTS-1*, que permitem certa estabilidade nas fibras do citoesqueleto, estando relacionada à geração ou manutenção de um habitat favorável para o desenvolvimento do parasita dentro da célula (DE AVALOS et al., 2002).

De forma importante, no mesmo trabalho foi demonstrado que somente após 24 horas p.i é que ocorre o aumento da expressão gênica de dezenas de proteínas associadas à resposta imune,

sendo que as mais aumentadas seriam interferon β (IFN- β) e genes induzidos por IFN (ISG), ISG54, STAT-1, MHC de classe I e dois genes que expressam proteínas reguladoras do IFN, IRF2 e IRF7, sugerindo que IFN do Tipo 1 (IFN- α e IFN- β) seria uma das primeiras e mais abundantes citocinas geradas na fase imediata da infecção. De fato, o que foi verificado em nível gênico parece corresponder aos experimentos realizados com IFN do Tipo I, mostrando que IFN- α/β estimulam macrófagos tissulares infectados para produção de Óxido Nítrico (NO) e destruição do parasita intracelular (COSTA et al., 2006) e animais deficientes do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), que são susceptíveis a infecção e não produzem IFN- β (Koga et al., 2006). Ainda, IFN- α/β leva a produção de Prostaglandina E₂ (PGE₂) em células não imunes transformadas por patógeno (RUSE et al., 1982) potencializando outras citocinas como a Interleucina 1 β (IL-1 β), produzidas por cardiomiócitos infectados (MACHADO et al., 2000) para produção de NO e que matam o parasita localizado nos tecidos (LAPOINTE & STIKINS, 1998; MACHADO et al., 2000).

Em modelo semelhante, usando o modelo de infecção em cultura de cardiomiócitos de camundongos, foi demonstrado que a infecção leva a rápida expressão de mRNA (12 horas) para Quimiocinas como KC (homólogo a IL-8 humana), MIG, IP-10, RANTES e MIP-1 α e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (CHANDRASEKAR et al., 1998; MACHADO et al., 2000) e IL-6 (CHANDRASEKAR et al., 1998), sugerindo que as quimiocinas geradas por células infectadas poderiam induzir a migração de células para o sítio de infecção. Posteriormente a produção de quimiocinas e citocinas poderia ser estimulada pela expressão de receptores para padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) como “Toll-like receptors” (TLR) (MEDZHITOV et al., 1997). De fato, foi demonstrado que fibroblastos infectados expressam grande quantidade de mRNA para TLR (24h) (DE AVALOS et al., 2002) e que outras células, como células cardíacas (QURESHI et al., 1999) e macrófagos (ROGER et al., 2005) também expressam TLR4. Assim, PAMPs como glicoproteínas mucina-like ancorados em glicofosfoinositol (tGPI) do parasita (COELHO et al., 2002) e biglicanas da matrix extracelular (SCHAEFER et al., 2005) poderiam interagir com TLR4 expressos em macrófagos tissulares ou células infectadas, e levar a produção de TNF- α , MIP-2 e MCP-1.

Assim, logo após a infecção, parece que há geração de sinais de perigo “Danger Hypothesis” (MATZINGER, 1994) que geram mecanismos tripanocida locais e induz a migração de células para o foco da infecção. Se isso ocorre, por que os parasitos não são totalmente

eliminados do tecido? A resposta pode ser porque concomitantemente com sinais de perigo há geração de mediadores que inibem as ações dos mecanismos de destruição do parasita, bem como, a atividade funcional de células recém migradas para o tecido infectado. E isso parece ser verdade, pois, nessa fase da infecção, tem sido verificado que embora haja produção de NO, ele não é efetivo para matar os parasitas (CHANDRASEKAR et al., 2000). Também pode ser devido à presença de citocinas como TGF- β e IL-10 (SILVA et al., 1998), citocinas que tem sido associadas à susceptibilidade a infecção por *T. cruzi* em diversos modelos (SILVA et al., 1992; REED et al., 1994) e a mediadores supressores de leucócitos gerados pelaIDO, (VINCENDEAU et al., 1999; DE AVALOS et al., 2002). Ainda, MCP-1 (COELHO et al., 2002; SCHAEFER et al., 2005) poderia atrair células T naturais, como as células T $\gamma\delta^+$ (PENIDO et al., 2003), para o local da infecção e com a infecção/destruição de células, proteínas do hospedeiro ou mesmo do parasita, como proteínas de choque térmico HSP (REQUENA et al., 1988; SAKAI et al., 1999; DE AVALOS et al., 2002) poderiam ativar células T $\gamma\delta^+$ (BORN et al., 1990; HAJASEKAR et al., 1990) para atividade supressora da inflamação e inibição da atividade funcional das células infiltradas (CARDILLO et al., 1993). A presença destes mediadores tornaria o ambiente menos hostil e permitiria que parte dos parasitas crescesse em células tissulares ou mesmo dentro de macrófagos.

À medida que a infecção avança, os mediadores gerados no sítio de infecção ou células hematopoiéticas infectadas parecem levar a ativação de células NK, que estão aumentadas no baço já no 2º dia de infecção (HATCHER et al., 1981; ANTUNES & CARDONI, 2004). Células NK são importantes para o controle do parasita (ROTTENBERG et al., 1998), principalmente na fase inicial da infecção (CARDILLO et al., 1996). A ativação de células NK possivelmente se deve a quimiocinas produzidas nas primeiras horas de infecção (MACHADO et al., 2000; COELHO et al., 2002; SCHAEFER et al., 2005), pois quimiocinas, como a MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, e MCP-1, induzem a ativação de células NK (TAUB et al., 1996) e MIP-1 α ainda poderia induzir migração destas células (ZENG et al., 2003).

No entanto, somente esses mediadores seriam insuficientes para a ativação plena de células NK (UNE et al., 2003), pois necessitam de IL-12 (KOBAYASHI et al., 1989; UNE et al., 2003), uma citocina relevante na resistência à infecção pelo parasita (SILVA et al., 1998). IL-12 é detectada entre 3 e 5 dias de infecção (GALVÃO DA SILVA & DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN, 2001) e seria produzida por macrófagos infectados (ALIBERTI et al., 1996;

FROSCH et al., 1996) ou mesmo por células dendríticas infectadas ou estimuladas com antígenos solúveis do parasita (TADOKORO & DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN, 2001) e assim, ativar células NK para produção de IFN- γ (CARDILLO et al., 1996; ANDERSSON et al., 2000) e quimiocinas, como MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, e Linfotacinas (DORNER et al., 2002). As células NK ativadas poderiam controlar eventuais parasitas circulantes, pois foi descrito que elas podem matar parasitas extracelulares por via independente de perforinas (LIECKE et al., 2004).

Ainda, as células NK, produzindo IFN- γ , uma citocina essencial na resistência a infecção por *T. cruzi* (JAMES et al., 1982; REED, 1988; TORRICO et al., 1991; SILVA et al., 1992; MINOPRIO et al., 1993; MILLER et al., 1997; HÖLSCHER et al., 1998), juntamente com a IL-12, podem induzir a produção de TNF- α (HUNTER et al., 1996), uma citocina importante para o controle do parasita na fase aguda (SANTOS LIMA et al., 1997), ativando os macrófagos infectados para produção de NO e destruição do parasita (VESPA et al., 1994; SILVA et al., 1995; ALIBERTI et al., 1996). A IL-12 e IFN- γ também seriam importantes para o controle e/ou destruição dos parasitos presentes nos tecidos (MICHAILOWSKY et al., 2001).

Deste modo, esse mecanismo envolvendo somente células da resposta imune inata estaria controlando os parasitas nesta fase da infecção, quando geralmente não são observados parasitas circulantes. Essa possibilidade foi comprovada pela infecção em animais IL-12ko, IFN- γ ko (MICHAILOWSKY et al., 2001) e animais depletados *in vivo* de células NK (ROTTENBERG et al., 1998; CARDILLO et al., 1996; LIECKE et al., 2004), nos quais é verificado um grande aumento da parasitemia.

Adicionalmente, a IL-12 e IFN- γ ativariam macrófagos (STEINMAN et al., 1980; FROSCH et al., 1997) e células dendríticas infectadas (TADOKORO & DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN, 2001; PLANELLES et al., 2003) para expressão de moléculas co-estimulatórias como B7 e moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC II), podendo assim ativar linfócitos T específicos ao parasita.

O papel dos linfócitos na infecção por *T. cruzi* é um fenômeno bastante explorado por pesquisadores. É conhecido que a ativação de células T CD4 (MINOPRIO et al., 1987; RUSSO et al., 1988; ARAÚJO, 1989; ROTTENBERG et al., 1992) e CD8 (TARLETON et al., 1992) na fase aguda da infecção, é necessária para a geração de uma resposta eficiente e duradoura, pois animais deficientes de células CD4 ou CD8 (ROTTENBERG et al., 1995) ou ambas

(KIERSENBAUM & PIENKOWSKI, 1979; ROFT et al., 2000), quando infectados, desenvolvem um intenso parasitismo e morrem precocemente.

Em outros patógenos intracelulares, como *Leishmania* (LOCKSLEY et al., 1987), *Mycobacterium* (ZHU et al., 1997) e *Listeria* (GENINAT et al., 1998), a geração de um padrão de resposta Th1 está relacionada à proteção e a predominância de uma resposta Th2 relacionada à susceptibilidade à infecção. As células Th1 dependem de IL-2 e IL-12, para sua diferenciação, migram através de quimiocinas ligantes a CXCR3 (IP-10 e MIG) ou CCR5 (RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β) e produzem IFN- γ , IL-2 e TNF- β (revisto por REINHARDT et al., 2006). As células Th2 dependem de IL-4, IL-10 para sua diferenciação, migra preferencialmente através de quimiocinas ligantes a CCR4 (TARC, MDC, CCL17, CCL22), CCR8 (CCL1) ou CCR2 (PD2) e produzem IL-10, IL-4 e IL-5 (revisto por REINHARDT et al., 2006).

Na infecção por *T. cruzi*, há evidências concretas sobre o papel protetor de células Th1 (NICKELL et al., 1993; HOFT et al., 2000; KUMAR & TARLETON, 2001) e o papel de exacerbador de células Th2 (BARBOSA-DE-OLIVEIRA et al., 1996). Ainda, independente do modelo animal ou infecção natural o *T. cruzi* predominantemente induz uma resposta Th1 em seu hospedeiro e, ao que tudo indica, o que torna o hospedeiro susceptível seria o grau de ativação destas células ou os níveis de outras citocinas que modulam esse tipo de resposta como a IL-10 aumentada que levaria a susceptibilidade (REED et al., 1994) ou a IL-10 em baixas quantidades, que levaria a resistência (HUNTER et al., 1997),

De fato, isso poderia ocorrer, pois foi demonstrado que células T e células B são funcionais nessa fase inicial da infecção, para a geração de resposta a antígenos T dependentes, levando a produção de anticorpos predominantemente IgG2a (dependentes de IFN- γ) (TARLETON & SCOTT, 1987). Recentemente, foi descrito que a ativação de células T CD8⁺, antígeno específicas para produção de IFN- γ , não seria dependente de células T CD4⁺ (PADILLA et al., 2007). Isso faz com que uma subpopulação de células T $\gamma\delta$ ⁺, presentes na fase aguda e expressando V γ 1, possa estar envolvida na geração de células T CD4⁺ e células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ (NOMIZO et al., 2006). Assim, as células T ativadas poderiam ser as responsáveis por um segundo pico de produção de IFN- γ , independente de células NK, que é verificado na fase inicial da doença (UNE et al., 2003). O fato de ter células T produtoras de IFN- γ intensifica a atividade tripanocida dos macrófagos e a geração de mediadores para a destruição de parasitas nos tecidos.

A destruição mais eficiente de parasitas levaria a liberação de antígenos do *T. cruzi* para circulação, mesmo antes da presença de parasitas circulantes (DE SIQUEIRA et al., 1979; AFFRANCHINO et al., 1989; CORRAL et al., 2002). Um fenômeno que estes antígenos poderiam induzir seria a ativação policlonal de linfócitos. O estudo do padrão hematológico de pacientes em fase aguda da Doença de Chagas mostrou que os mesmos apresentam uma leucocitose muito pronunciada, predominantemente de células mononucleares (JAMRA et al., 1954) e esplenomegalia (CHAPUIS, 1973).

Estudos posteriores mostraram que a leucocitose é decorrente da ativação policlonal de células B (KIERZENBAUM & HAYES, 1980) do tipo B1 (Ly-1⁺-CD5⁺) e B2 (MINOPRIO et al., 1986; MINOPRIO et al., 1989), mobilizadas do omento e medula óssea, respectivamente (MARCONDES et al., 2000). A ativação de células B leva sua diferenciação a plasmócitos secretores de anticorpos, causando hipergamaglobulinemia, com predomínio de isotipos IgM, IgG2a e IgG2b (ORTIZ-ORTIZ et al., 1980; TARLENTON & KUHN, 1983; MINOPRIO et al., 1986; SPINELLA et al., 1989). A análise da reatividade dos anticorpos policlonais indicou a presença de anticorpos parasito-específicos (TARLENTON & KUHN, 1983), apesar de outros estudos mostrarem que a maioria destes anticorpos não possui especificidade para parasita e apresentariam reatividade para uma variedade de antígenos, inclusive antígenos próprios (MINOPRIO et al., 1986; MINOPRIO et al., 1989b).

A ativação policlonal também ocorreria em linfócitos T (KIERZENBAUM & HAYES, 1980) e seria caracterizada pela produção de IL-2, expressão de receptores para IL-2 e intensa atividade proliferativa (ROTTENBERG et al., 1989). O aumento numérico de células T também poderia ser decorrente da mobilização de linfócitos T recém-migrados do timo (SAVINO et al., 1989). Aparentemente, todas as subpopulações de células T são ativadas, seja apresentando marcador CD4⁺, CD8⁺ ou duplo-negativas CD4⁻CD8⁻ (MINOPRIO et al., 1986; MINOPRIO et al., 1989). No entanto, comparativamente, ocorreria uma ativação preferencial de células CD8⁺ (KIERZENBAUM & HAYES, 1980; MINOPRIO et al., 1986b). As causas da ativação policlonal em linfócitos é um fenômeno que estaria associado principalmente aos ativadores policlonais (Ag) do parasita (HERNANDEZ-MUNAIN et al., 1992; MONTES et al., 1996; DA SILVA et al., 1998; MONTES et al., 1999; BILATE et al., 2000), estimulando diretamente os linfócitos ou ativando as células para secreção de citocinas como células T CD4⁺ (MINOPRIO et al., 1987; SPINELLA et al., 1989) e CD11b⁺ (MONTES et al., 2006).

Outra anormalidade que ocorreria em linfócitos T, durante essa fase de infecção é a imunossupressão. Experimentos *in vivo*, utilizando antígenos não correlacionados ao parasita ou mesmo bactérias, mostraram que animais agudamente infectados com *T. cruzi*, quando imunizados, suprimem a resposta de células T (KIERZENBAUM, 1975; REED et al., 1976; TEIXEIRA et al., 1978). Isto também foi verificado *in vitro*, pela cultura de células T do baço provenientes de animais com diferentes dias de infecção, mostrando que a imunossupressão ocorre no mesmo período em que se verifica a presença de ativação policlonal (CUNNINGHAM & KUHN, 1980; KIERZENBAUM & HAYES, 1980; HAYES & KIERZENBAUM, 1981).

A imunossupressão de células T pode ser induzida por tripomastigotas em cultura (MALECKAR & KIERZENBAUM, 1983), por determinados antígenos do parasita circulante presentes em animais infectados (KIERZENBAUM et al., 1994) ou por fatores supressores produzidos por células esplênicas de animais infectados (CUNNINGHAM & KUHN, 1980b), como macrófagos (KIERZENBAUM, 1982). Em células esplênicas, o efeito supressor é revertido parcialmente pela adição de indometacina e outros inibidores de COX (TARLETON et al., 1988a; NOMIZO et al., 1995; CELENTANO et al., 1995; PINGE-FILHO et al., 1999; MELO et al., 2003; MICHELIN et al., 2005). Outros fatores supressores induzidos por extrato do parasita em células de animais infectados, que seriam insensíveis a indometacina (TARLETON et al., 1983b) poderiam levar a imunossupressão de células T. Esta supressão também poderia estar relacionada à incapacidade destas células produzirem IL-2 e responder a IL-2 adicionada na cultura (HAREL-BELLAN et al., 1983), e a inibição da expressão IL-2, IL-2R, c-myc e c-fos (SOONG & TARLETON, 1992). Ou ainda poderia ser decorrente da atividade supressora das células T $\gamma\delta^+$ (CARDILLO et al., 1993), do bloqueio na sinalização via complexo receptor de células T e moléculas CD3 (TCR-CD3) (LOPES & DOS REIS., 1994) e da regulação de células T pela interação B7-CTLA4 (MARTINS et al., 2004).

No entanto, a imunossupressão em células T seria induzida por mediadores e citocinas produzidos para controlar o parasita, como o IFN- γ , TNF- α/β e NO (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1995). De fato, isso é perfeitamente possível, pois macrófagos ativados por TNF- α e IFN- γ produzem NO e matam o parasita (VESPA et al., 1994; SILVA et al., 1995; ALIBERTI et al., 1996). No entanto, TNF- α e IFN- γ também estimulam os macrófagos para produção de PGE₂ (DINARELLO et al., 1986; BACHWICH et al., 1986; ARENZANA-SEISDEDOS et al., 1987; HART et al., 1988; VILA-DEL SOL & FRESNO, 2005) e foi demonstrado que PGE₂ está

aumentada nessa fase da infecção (MICHELIN et al., 2005). A PGE₂ estimularia o macrófago a produzir mais NO (MAUEL et al., 1995; PINGE-FILHO et al., 1999) e, desta forma, a produção excessiva de mediadores, estaria favorecendo o parasita, que encontra um ambiente de imunossupressão dominante, permitindo sua replicação e diferenciação até tripomastigotas que seguem pela circulação sanguínea. Com a presença da parasitas circulantes, a imunossupressão e a ativação policlonal se tornam mais intensas (TEIXEIRA et al., 1978; KIERZENBAUM & HAYES, 1980), possivelmente pela uma produção maciça de citocinas e NO (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996), concomitante com o controle do número de tripomastigotas, mediado por NO e outros mecanismos independentes de NO (NATHAN et al., 1979; REED et al., 1987; DA MATTA et al., 2000; CUMMINGS & TARLETON, 2004).

Esse cenário levaria a uma intensa indução de apoptose do parasita e células do hospedeiro (LOPES et al., 1995; BILLAUT-MULOT et al., 1996; DE SOUZA et al., 2003). A apoptose em células hematopoiéticas seria induzido por citocinas como TNF- α e IFN- γ via indução de NO (MARTINS et al., 1998) ou antígenos do parasita como os glicoinositolfosfolipídeos (GIPL) (FREIRE-DE-LIMA et al., 1998) e HSP-70 (MARAÑÓN et al., 2000), através da interação Fas-FasL (LOPES et al., 1999; MARTINS et al., 1999). A apoptose também ocorreria nos linfonodos (DE MÉIS et al., 2006) e timo (VERINAUD et al., 1998; LEGUIZAMON et al., 1999). De forma curiosa, a apoptose em timócitos são independentes de Fas e Perforinas (HENRIQUE-PONS et al., 2004) e é induzida por ATP exógeno (MANTUANO-BARRADAS et al., 2003), trans-sialidases dos parasitas (LEGUIZAMON et al., 1999) e aumento nos níveis de glicorticoides no timo (ROGERRO et al., 2006). A apoptose de células T em diferenciação no timo em animais infectados, durante a fase aguda, parece afetar a seleção tímica de células auto-reativas, pois mostrou levar a um aumento de células T auto-reativas V β 5⁺ e V β 12⁺ nos órgãos periféricos, sugerindo que estas células poderiam participar na patogênese durante a fase crônica (MENDES-DA-CRUZ et al., 2003).

O processo de apoptose seria favorável a persistência do parasita ou mesmo estaria contribuindo para que a parasitemia ocorra, já que foi elegantemente mostrado que a fagocitose de linfócitos apoptóticos por macrófagos infectados, leva os macrófagos a secretar significativas quantidades de TGF- β e PGE₂ (mediadores imunossupressores) e aumentando os níveis de poliaminas como a putrescina (essenciais para o desenvolvimento do parasita) no citoplasma, fazendo com que estes macrófagos liberem mais parasitas (FREIRE-DE-LIMA et al., 2000).

Ainda, mostraram que a injeção de células apoptóticas em animais infectados, leva a um grande aumento da parasitemia. O aumento da parasitemia induzido por células apoptóticas, ou mesmo, a parasitemia em animais controles pode ser drasticamente reduzidos pelo tratamento com uma única dose de aspirina ou indometacina (FREIRE-DE-LIMA et al., 2000).

Um ponto importante relativo à resistência do hospedeiro a infecção por *T. cruzi*, é que células T produtoras de citocinas tipo 1 como o IFN- γ seriam essenciais no controle de parasitas na fase aguda e crônica da doença (JAMES et al., 1982; REED, 1988; TORRICO et al., 1991; SILVA et al.; 1992; MINOPRIO et al., 1993; MILLER et al., 1997; HÖLSCHER et al., 1998). A resistência mediada por IFN- γ estaria relacionada à quantidade e período que essa citocina é produzida, pois ela em excesso, também exacerbaria a infecção pela produção excessiva de NO (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1995; MARTINS et al., 1999; CARDILLO et al., 2004).

Até a pouco tempo atrás, não se sabia como estas células primadas pelo parasita no início da infecção poderiam ser mantidas durante uma resposta poderosa, em que há inúmeros mediadores e ligantes desfavoráveis a sua manutenção. Assim, em modelos utilizando transferência de células Th1 para recipientes SCID (animais que não geram linfócitos) foi demonstrado que estas células são ativadas, controlam os parasitas na fase aguda e persistem por longo tempo no animal (HOFT et al., 2000). Do mesmo modo, utilizando *T. cruzi* transgênicos expressando ovalbumina (*T.cruzi*-G-OVA), os autores geraram células Th1 em animais transgênicos (DO11.10) que expressam exclusivamente, células T TCR-OVA específicas. Usando o modelo de transferência de células Th1 específicas para OVA em camundongos BALB/c e infectando-os com *T.cruzi*-G-OVA, verificaram que estas células protegem o animal durante a fase aguda, secretam IFN- γ e expandem, mesmo em fases da infecção em que há ativação policlonal, parasitas circulantes e se mantêm por longos períodos durante a fase crônica (KUMAR & TARLETON, 2001).

Recentemente, foi demonstrado que os diferentes linfócitos de esplênicas de animais, na fase aguda da doença, apresentam diferentes sensibilidades para entrarem em apoptose após estimulação com anti-Fas, sugerindo que a infecção estaria afetando o processo de morte celular e, conseqüentemente, alterando o repertório de células imunes (LOPES et al., 1995; LOPES et al., 1996; NAKAJIMA-SHIMADA et al., 2000). Em outro trabalho, foi mostrado que molécula FasL seria relevante para a formação de um padrão e manutenção de células T durante a fase aguda da infecção (COSTILLA GUILHERMO et al., 2007). Os autores verificaram que o

bloqueio da molécula FasL em células de animais infectados com anticorpos monoclonais anti-FasL, inibe a apoptose de células CD8⁺ parasitas específicos e permite as células CD4⁺ específicas produzirem IL-4 e IL-10. A administração de anti-FasL, na fase inicial da infecção, inibe a apoptose de células CD8⁺, reduz a parasitemia, aumenta a quantidade de células T ativadas, aumenta a produção de NO, reduz a quantidade de tripomastigotas liberados por macrófagos peritoneais e faz com que ao longo desta fase a proporção CD8:CD4 permaneça aumentada. E de forma importante, no final da fase aguda, as células esplênicas de animais tratados com anti-FasL, apresentam capacidade para produção aumentada de IFN- γ e níveis detectáveis de IL-4 e IL-10.

Esses dados são extremamente importantes, pois indicam que a presença de citocinas do tipo 2, como IL-10, são necessárias para que o animal controle mais eficientemente o parasita durante a fase aguda e, possivelmente, sejam cruciais para que os animais sobrevivam. De fato, isso foi mostrado anteriormente para IL-10 (ZHANG & TARLETON, 1996; HUNTER et al., 1997), IL-27 (HAMANO et al., 2003) e IL-4 (SOARES et al., 2003); e ainda, outros trabalhos mostraram que a capacidade muito reduzida para produção de IL-10 (ROGGERO et al., 2002) ou mesmo a ausência de IL-10 levam a uma extrema susceptibilidade e morte dos animais (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996; HÖLSCHER et al., 2000). Por outro lado, o aumento excessivo de IL-10 leva a exacerbação da doença (REED et al., 1994).

A presença reduzida ou ausência de IL-10 na susceptibilidade a *T. cruzi* parece estar associada ao aumento da produção de TNF- α e elevada produção de NO (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996; HÖLSCHER et al., 2000; ROGGERO et al., 2002). De fato, na infecção por *T. cruzi* foi mostrado que a produção de elevadas quantidades de TNF- α (RUSSO et al., 1989; MARTINS, 1998; HÖLSCHER et al., 2000; ROGGERO et al., 2002; BASSO et al., 2004) e NO (MARTINS, 1998; MARTINS et al., 1999; CARDILLO et al., 2004; BASSO et al., 2004, QUAISSI & QUAISSI, 2005; WALLACE, 2005), estariam correlacionadas à susceptibilidade ao parasita. Assim, para que o animal possa controlar o máximo de parasitas durante a fase aguda seria necessário a produção de níveis relativamente altos de citocinas do tipo 1 e níveis relativamente baixos de citocinas do tipo 2.

A importância das células B pela produção de anticorpos parasito-específicos predominantemente IgG dos isotipos IgG2a, IgG2b (STEFANI et al., 1983), é conhecida de longa data (BUDZKO et al., 1975; KIERSZENBAUM & HOWARD, 1976; MCHARDY, 1977;

NOGUEIRA et al., 1977). No entanto, durante a fase aguda, diversos trabalhos têm demonstrado que há produção de anticorpos específicos (SCHMUNIS et al., 1978; PERALTA et al., 1980; GUHL & MARINKELLE, 1982; TARLETON & KUHN, 1983; DUTHIE et al., 2002), porém o papel dos anticorpos é relativo (SCOTT, 1981; MINOPRIO et al., 1986; MINOPRIO et al., 1989b; KUMAR & TARLETON, 1998) ou mesmo desnecessário (KIERSZENBAUM & PIENKOWSKI, 1979; TRISCHMANN, 1983; MILLER et al., 1997).

Entretanto, anticorpos seriam importantes para a resistência durante a fase crônica, pois em modelos animais e humanos, anticorpos líticos e citotóxicos têm sido correlacionados a resistência a infecção (BUDZKO et al., 1975; KRETTLI & BRENER, 1976; SCOTT, 1981; KRETTLI & BRENER, 1982; VOLTARELLI et al., 1983). Um fenômeno pouco explorado é das células B como produtoras de citocinas. Foi descrito que as células B1 (CD5⁺) ou células B naturais, que produzem anticorpo de para antígenos T independentes e só secretam IgM, são excelentes produtoras de IL-10 e estariam relacionadas com a susceptibilidade a infecção por *T. cruzi* e resistência em camundongos XID, que tem células B2, mas não B1 (MINOPRIO et al., 1991; MINOPRIO et al., 1993). Recentemente, foi mostrado que células B2 também secretam citocinas durante a infecção por *T. cruzi*, como IL-4, IL-10, e IFN- γ (MONTES et al., 2006).

E relação ao controle de parasitas nos tecidos, tanto os miócitos como as células inflamatórias seriam relevantes. A idéia anterior que somente as células inflamatórias seriam as responsáveis pela destruição dos parasitas tissulares não parece ser verdadeira. Assim, o fato das células serem infectadas ou ainda ativadas pela sinalização via TLR4 (QURESHI et al., 1999; COELHO et al., 2002; SCHAEFER et al., 2005) produzem mediadores, como o IFN- α/β (RUSE et al., 1982; KOGA et al., 2006), PGE₂ (LAPOINTE & STIKINS, 1998), IL-1 β (CHANDRASEKAR et al., 1998; MACHADO et al., 2000; FICHERA et al., 2004) e TNF- α (SANTOS LIMA et al., 1997; CHANDRASEKAR et al., 1998; FICHERA et al., 2004) e IL-6 (CHANDRASEKAR et al., 1998), que seriam relevantes para que por exemplo, os miócitos destruam o parasito via indução de NO (MACHADO et al., 2000; MICHAILOWSKY et al., 2001; FICHERA et al., 2004). Em relação o controle de parasitas via NO, a sua produção parece ser independente de NOS2 (CUMMINGS & TARLETON, 2004) e a indução de NO por TNF- α não seria inibida por L-NAME (FICHERA et al., 2004), podendo também matar o parasita via indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) (CASTAÑO-VELEZ et al., 1998).

Os miócitos também produzem quimiocinas, que seriam as responsáveis pela atração de células mononucleares como MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , KC e MIP-2 (MACHADO et al., 2000; TALVANI et al., 2000). Em relação às células, tem sido descrito que as principais células atraídas para o sítio de infecção seriam os macrófagos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (TALVANI et al., 2000; MARINO et al., 2004) positivos para CCR5⁺ (MARINO et al., 2004; HARDISON et al., 2006). De forma interessante, a expressão mRNA de IL-12 e IFN- γ temporalmente correlaciona com a presença de infiltrado celular (TALVANI et al., 2000), sugerindo que estas células seriam as responsáveis pela produção de IL-12 e IFN- γ . A IL-12 administrada em animais infectados, reduz significativamente a parasitemia e induz a destruição de parasitas nos tecidos (HUNTER et al., 1996). Diversos trabalhos demonstraram que a deficiência de IL-12 eleva o número de parasitas tissulares (TALVANI et al., 2000; MICHAILOWSKY et al., 2001; MULLER et al., 2001; GRAEFE et al., 2003). Até o momento, não há informações concretas que esta citocina poderia atuar em miócitos estimulando-os para destruição do parasito. Assim, IL-12 poderia estar inibindo a produção de IL-4 uma citocina que inibe a atividade de citocinas como IFN- γ , pois animais deficientes de IL-12 aumentam a produção de IL-4 (GRAEFE et al., 2003) e animais IL-4ko apresentam maior eficiência para eliminação do parasita nos tecidos (SOARES et al., 2001; MICHAILOWSKY et al., 2001).

Outro papel exercido pela IL-12 seria induzindo a produção de IFN- γ em células mononucleares inflamatórias (HUNTER et al., 1996; GRAEFE et al., 2003), que não seriam células T CD4⁺ ou CD8⁺ ou células NK (HUNTER et al., 1996). O IFN- γ induziria a produção de RANTES, MIG e IP-10 (TALVANI et al., 2000; ALIBERTI et al., 2001) que poderiam levar a expressão de ICAM-1 no endotélio (MICHAILOWSKY et al., 2004), permitindo a migração de linfócitos até o sítio de infecção (ALIBERTI et al., 2001). Ainda, o IFN- γ poderia estimular miócitos para destruição dos parasitas (CASTAÑO-VELEZ et al., 1998; MACHADO et al., 2000), porém por um mecanismo independente de NO (FICHERA et al., 2004). Finalmente, IFN- γ em sinergismo com β -quimiocinas (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES e MCP-1) poderiam favorecer a captura de parasitas liberados dos ninhos e destruí-los pela indução de NO (ALIBERTI et al., 1999) ou um mecanismo ainda desconhecido independente de NO (FICHERA et al., 2004). Nesse sentido, em modelo de co-cultivo de fibroblastos infectados com diferentes populações de células provenientes do baço de animais infectados, foi verificado que células T CD4⁺ e células B

secretam um fator que inibe drasticamente a liberação de parasitas pelos fibroblastos (ROWLAND & CHEN, 2003).

Na fase crônica da infecção, foi mostrado que linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$, específicos para os parasitas, expressam $CD62L^{\text{baixo}}$, um marcador de células de memória efetora (T_{EM}), e ao serem estimulados com antígenos do parasita produzem $IFN-\gamma$, indicando que continuam mantendo o padrão de células produtoras de citocinas do tipo 1 (HOFT et al., 2000; GRISOTTO et al., 2001; MARTIN & TARLETON, 2005) e que, possivelmente, essas células T_{EM} estariam sendo mantidas por células $NK1.1^+$ (CARDILLO et al., 2002; CARDILLO et al., 2004). Ainda, animais na fase crônica, comparados aos animais controles, têm um número de macrófagos e células B maior no baço (MARINHO et al., 1999), sugerindo que estas células, juntamente com as T_{EM} , seriam as responsáveis pelo controle dos parasitas. Em relação às citocinas produzidas por células esplênicas de animais crônicos não sintomáticos, foi verificado que, diferentemente das T_{EM} , elas secretam IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, e $TGF-\beta$ e continuam com este padrão indefinido até 700 dias de infecção (ZHANG & TARLETON, 1996).

Em relação às células infiltradas nos tecidos como coração e músculos esqueléticos, a maioria dos trabalhos indica a presença de células T $CD4^+$, macrófagos $F4/80^+$ (Hardison et al., 2006) e células T $CD8^+$ (TARLETON & ZHANG, 1999; HARDISON et al., 2006). De forma consensual, todos os trabalhos demonstram um maior número de células $CD8^+$ em relação às células $CD4^+$. Mais ainda, a maioria dos linfócitos T são $CCR5^+$, indicando que são responsivos a quimiocinas do tipo 1 ($Th1$) (MARINO et al., 2004).

Na imunopatologia, existe uma controvérsia sobre quem seria o responsável pela inflamação durante a fase crônica, o parasita ou auto-imunidade? Evidências demonstram que ambos são responsáveis. Assim, a fase crônica da Doença de Chagas seria devido à persistência e quantidade de parasitas presentes nos chagásicos, pois foi demonstrada em animais de experimentação que há uma correlação entre o número de parasitas inoculados, maior presença de ninhos amastigotas, persistência dos parasitas no tecido e resposta inflamatória (TARLETON, 2001; TARLETON et al., 1994). Mais ainda, em pacientes que manifestam a fase crônica, há uma correlação entre a gravidade da doença com o número parasito e presença de infiltrado inflamatório (HIGUCHI, 1997). Assim, a fase crônica seria decorrente somente da resposta imune exacerbada (Reação de Hipersensibilidade Tardia) ao parasita. (HIGUCHI, 1997; TARLETON, 2001; TARLETON, 2003).

Outra linha de investigação mostrou que a fase crônica poderia ser desencadeada por uma resposta auto-imune (TEIXEIRA et al., 1975a/b; RIBEIRO-DOS-SANTOS & HUDSON, 1980; CUNHA-NETO & KALIL, 1995; LEON & ENGMAN, 2001). Essa hipótese é fundamentada porque no soro de pacientes ou animais infectados apresentam anticorpos que reagem com antígenos do coração (MCCORNICK & ROWLAND, 1989, RIZZO et al., 1989; CUNHA-NETO et al. 1995) e antígenos neuronais (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al. 1979, VAN VOORHIS & EISEN, 1989) e animais cronicamente infectados apresentam células T citotóxicas específicas para fibras cardíacas (TEIXEIRA et al., (1975a/b). Posteriormente, foi demonstrado que células esplênicas de animais cronicamente infectados que apresentam miocardite, depletadas de linfócitos T CD4⁺ quando transferidos para recipientes singenéticos, são incapazes de causar inflamação ou lesão em tecido cardíaco ectópico na orelha (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al. 1992).

Os camundongos atímicos, deficiente de células T, infectados apresentam elevada parasitemia e ausência de inflamação (SOARES et al., 2001), por outro lado, células T CD4⁺ isoladas do coração de animais infectados crônicos quando transferidos para recipientes singenéticos induzem miocardite na ausência de parasitas (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al. 2001; GIRONES et al., 2001). Ainda, a ausência de correlação entre a presença do parasita e a manifestação da fase crônica tem sido demonstrada em modelos experimentais e biopsias de pacientes (BARBOSA JR & ANDRADE 1984, JONES et al. 1993, PALOMINO et al., 2000), mesmo pela utilização de técnicas sensíveis como imunohistoquímica e PCR (PALOMINO et al., 2000, OLIVARES-VILLAGOMEZ et al., 1998). Finalmente, foi demonstrado que há mimetismo antigênico entre o antígeno B13 de *T. cruzi* e a miosina do coração (CUNHA-NETO et al., 1995) e presença de células T específicas para antígenos do coração, que foram isolados de pacientes chagásicos crônicos (CUNHA-NETO et al., 1995; CUNHA-NETO et al., 1996; GARCIA et al, 2003).

Na imunopatologia, existe uma controvérsia sobre as células T relacionadas com a lesão. Por um lado, alguns trabalhos indicam que seriam as células T CD4⁺ (RUSSO et al, 1988; RIZZO et al., 1989; DOS SANTOS et al., 1992) e outros indicam que seriam as células T CD8⁺ (TARLETON et al., 1992; HIGUCHI et al., 1993). Possivelmente, as duas seriam importantes (MICHAJLOWSKY et al., 2004; FUENMAYOR et al., 2005), no entanto, ambas secretariam

citocinas do tipo 1, como IFN- γ e TNF- α (TALVANI et al., 2000; DOS SANTOS et al., 2001) e seriam CCR5⁺ (MACHADO et al., 2005).

Em relação às citocinas envolvidas na lesão, tem sido verificado que o TNF- α produzido por células inflamatórias teria um papel regulador e seria dependente do receptor p55, mas não p75 (ALIBERTI et al., 2001), visto que, animais TNFRp55ko apresentam um grande aumento no infiltrado inflamatório e na lesão tissular (CASTAÑO-VELEZ et al., 1998; ALIBERTI et al., 2001). IL-4, embora tenha um papel inibitório na destruição do parasita tissular durante a fase aguda, na fase crônica, ela seria relevante para inibir a inflamação, pois animais IL-4ko apresentam uma inflamação severa (SOARES et al., 2001; MICHAILOWSKY et al., 2001). IL-10 e IL-27 também estariam envolvidas na imunopatologia, já que animais IL-10ko (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996; HÖLSCHER et al., 2000) e WSX-1ko (IL-27Rko) (HAMANO et al., 2003) apresentam uma inflamação bastante aumentada. Finalmente, em humanos a forma cardíaca sintomática correlaciona com a presença de altos títulos de anticorpos reativos ao parasita e a antígenos cardíacos (GIRONES & FRESNO, 2003).

A resistência na fase aguda da infecção por *T. cruzi* estaria relacionada à geração de uma resposta balanceada, possivelmente, dependente de uma variedade de células, como macrófagos, células NK, células T naturais (NKT e T $\gamma\delta^+$), células T CD4⁺, T CD8⁺, células B e propriedades “imunológicas” de células de tecidos alvos, como coração, músculo esquelético e fígado, que somente agora vem sendo investigados. Esta complexa rede de comunicação deveria gerar uma resposta balanceada, com altos níveis relativos de citocinas do Tipo 1 (IL-12 e IFN- γ) e baixos níveis relativos de citocinas do Tipo 2 (IL-10, IL-4, IL-27 e TGF- β). Na fase crônica, fica patente a necessidade de células T de memória, resposta polarizada Tipo 1 nos órgãos infectados, e não polarizada a nível sistêmico. Em parte, isso parece ser verdade, pois, recentemente, utilizando um protocolo de imunização intradérmica ou imunização por via oral, através de duas infecções usando baixas quantidades de parasitas, seguidas de tratamento com nifurtimox (para geração de células de memória) e posterior desafio com altas quantidades de parasitas em camundongos controles e CD4ko, CD8ko, β 2-microglobulina, β 2m-ko (não apresentam células T restritas a MHC classe I, como CD8⁺), iNOSko, IL-12ko, IFN- γ ko, IL-4ko, foi verificado que a maioria dos animais “vacinados” apresenta baixíssimos números de parasitas analisados por PCR, sendo que, os únicos animais que não apresentam resistência são os animais IL-12ko, IFN- γ ko e β 2m-ko. Ademais, foi visto que o animal imunizado mais resistente foi o IL-4ko (HOFT & EICKHOFF,

2005). Estes dados, comprovam a necessidade de citocinas do Tipo 1 para a proteção e indicam que células restritas a MHC I clássicas (células CD8⁺) e células restritas a MHC Ia e MHC Ib (células NKT e determinadas subpopulações de células T $\gamma\delta^+$) seriam relevantes para gerar uma resposta protetora contra o parasita. Ainda, este trabalho demonstra que na ausência de um mediador tripanocida, outros mediadores tornam-se relevantes e são capazes de eliminar o patógeno.

Em relação à imunopatologia da fase crônica, um estudo recente, utilizando um clone de *T. cruzi* (Sylvio X10/4) que induz imunopatologia em 100% dos animais C3H/HePAS e animais A/J, verificou que camundongos C3H/HePAS desenvolvem intensa imunopatologia no coração e uma moderada imunopatologia na musculatura esquelética. Por outro lado, camundongos A/J desenvolvem imunopatologia exclusivamente no fígado e musculatura esquelética. Ao fazerem um cruzamento (C3H/HePAS x A/J), verificaram que a geração F1 não apresenta patologia significativa tanto no fígado como no coração. No entanto, a geração F2, apresenta severa imunopatologia tanto no fígado como no coração. Esses dados indicam que a imunopatologia é decorrente de um controle poligênico que não segrega com padrão mendeliano clássico e, de forma importante, sugere que a imunopatologia seria dependente majoritariamente de fatores genéticos do hospedeiro (MARINHO et al., 2004).

Finalmente, a análise de múltiplos genes por Microarray em células do baço de camundongos parentais C57BL/6 e DBA/2, susceptíveis a infecção por *T. cruzi*, comparados com a geração F1 (C57BL/6 x DBA/2) resistente ao parasita, mostrou que dos 10 genes relacionados com a resistência, 7 estão relacionados às moléculas de MHC, 2 a genes regulados por citocinas como IFNs e TNF e 1 relacionado aos genes da região variável da imunoglobulina IgG2a (GRAEFE et al., 2006). Reforçando ainda mais que resistência estariam relacionados a fatores imunogenéticos.

1.2.1. Mediadores lipídicos

Os lipídeos, juntamente com as proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, são as principais macromoléculas biológicas. Em meio biológico, podem apresentar estruturas cíclicas como o colesterol ou alicíclicas como os fosfolipídios. Geralmente apresentam alto valor calórico, são os principais constituintes estruturais das membranas biológicas e podem exercer

atividade hormonal ou atuarem como mediadores capazes de agir sobre células alvo que apresentam receptores específicos.

Como exemplo de hormônios derivados do colesterol, temos os glicocorticóides, mineralocorticóides, estrógeno, progesterona e testosterona; e de mediadores lipídicos temos os metabólitos da oxidação do ácido aracdônico como prostaglandinas, leucotrienos e PAF. Entretanto, diferentemente dos hormônios, estes mediadores apresentam geralmente ação parácrina e são derivados de fosfolipídios presentes na membrana nuclear ou em compartimentos intracitoplasmáticos como os corpos lipídicos. Apesar das diferenças ambos, os hormônios esteroidais e os metabólitos do ácido aracdônico exercem profundo efeito regulatório sobre células do sistema imunológico (PERES et al., 2005; VENKATESH et al., 2006; LANGE et al., 2006).

O ácido aracdônico, presente nos fosfolipídios de membrana, são liberados pela ação de enzimas como a fosfolipase A_2 (PLA_2). O ácido aracdônico livre pode gerar diversos metabólitos biologicamente ativos, chamados eicosanóides, em reação catalisada pela ação de dois tipos de enzimas as cicloxigenases (COX) ou lipoxigenases (LOX). O ácido aracdônico é convertido a prostaglandina (PG) H_2 pela PGH sintase-1 ou -2, também chamadas cicloxigenases (COX)-1 e -2. As isoenzimas catalisam dois passos de reação, primeiro ciclizando o ácido aracdônico a forma PGG_2 e então o reduzindo a forma PGH_2 . PG sintases de células específicas catalisa a conversão de PGH_2 em produtos finais biologicamente ativos incluindo PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGD_2 , PGI_2 e tromboxano (TX) A_2 , conhecidos coletivamente como prostanóides. Ainda, o ácido aracdônico pode ser metabolizado por diferentes lipoxigenases (LO) e convertidos a ácidos hidroieicosanóides (HETEs) e leucotrienos (LTs) (Rocca & FitzGerald, 2002). O passo inicial é a oxidação do ácido aracdônico a um intermediário instável LTA_4 pela enzima 5-LO em conjugação com a proteína auxiliar FLAP (5-LO-activing protein). LTA_4 pode ser hidrolisado e formar LTB_4 , ou conjugado a glutathione formando LTC_4 . LTC_4 é convertido a LTD_4 e LTE_4 pelo metabolismo extracelular e estas três moléculas são coletivamente chamadas cisteinil-leucotrienos (CysLTs) ou peptidoleucotrienos. Similar aos prostanóides, o efeito biológico dos LTs mediam sua sinalização via receptores acoplados a proteína G. LTB_4 se liga a receptores BLT1 em leucócitos. Um segundo receptor foi recentemente identificado, mas sua função ainda não está claramente definida. Dois receptores, CysLT1 e CysLT2, medeiam às ações de CysLTs (revisto em ROCHA et al., 2003).

Figura 1.: Formação dos mediadores lipídicos a partir de fosfolípidios de membrana.

Os leucotrienos são mediadores lipídicos que apresentam papel relevante na resposta imune e homeostase tecidual (FUNK, 2001). A biossíntese dos leucotrienos a partir do ácido aracídônico foi inicialmente descrita em leucócitos polimorfonucleares e monócitos. Foram descritos primeiramente em 1937, como “slow reacting substances of anaphylaxis” (SRS-A), e são agora conhecidos como CisLTs, LTC₄, LTD₄ e LTE₄ (citado em LEWIS et al., 1990).

Os leucotrienos são produzidos predominantemente por células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos ativados e mastócitos. As células dendríticas são as principais participantes tanto na resposta imune inata quanto na resposta imune adquirida. Além da sua importante função como célula apresentadora de antígenos do sistema imune, elas possuem uma maquinaria enzimática para converter ácido aracídônico em leucotrienos pró-inflamatórios (HARIZI et al., 2003; HARIZI & GUALDE, 2004). Ainda, todos os fenótipos de células dendríticas parecem expressar constitutivamente a via 5-LO, assim o papel dos mediadores lipídicos derivados da 5-LO de células dendríticas seriam críticos na regulação da resposta imune. Os leucotrienos podem apresentar funções para eventos da resposta imune como induzindo a inflamação, ativando células para função efetora ou inibindo a função de células, bem como o processo inflamatório (revisto em SPANBROEK et al., 2000; PETERS-GOLDEN et al., 2005).

Em tecidos humanos, a análise por Northern blot demonstrou que mRNA para receptor de LTB₄, BLT1 e BLT2 são expressos no timo e leucócitos, enquanto que no baço, há uma predominância de expressão de receptores para LTB₄ do tipo BLT2 (YOKOMIZO et al., 2001). Em relação aos receptores de Cis-Leucotrienos, foi demonstrado que no baço, em células progenitoras da medula óssea e em leucócitos mononucleares do sangue estão expressos tanto os receptores CysLT1 como cysLT2, e nos linfonodos, exclusivamente, CysLT2 (KAMAOKA & BOYCE, 2004).

A produção elevada de leucotrienos parece estar relacionada a diversas doenças inflamatórias, incluindo asma, artrites, glomerulonefrite, doenças inflamatórias do intestino e hepatite aguda pelo recrutamento e estimulação de outras células inflamatórias (revisto em PETERS-GOLDEN et al., 2005). Uma vez que os leucotrienos dispõem de uma grande variedade de efeitos biológicos, não é surpreendente que a biossíntese de leucotrienos celular seja finamente regulada. Baseado no conhecimento da regulação da via 5-LO, tornou-se evidente que a biossíntese de leucotrienos é modulada por múltiplos mecanismos, incluindo expressão de genes, efeitos de citocinas, movimentos de enzimas e compartimentalização da via 5-LO. Assim, o conhecimento do preciso mecanismo regulatório da atividade da 5-LO poderiam promover novas concepções para o desenvolvimento de drogas imunomoduladoras.

Dois passos estão envolvidos no controle da biossíntese dos leucotrienos: a liberação de ácido aracdônico e a regulação da atividade da 5-LO. A expressão de 5-LO e FLAP são considerados determinantes na biossíntese de leucotrienos (revisto em NASSAR et al., 1997). Outra possibilidade, é a modulação da expressão de componentes enzimáticos através de mecanismos transcricionais e pós-transcricionais. Citocinas e outros componentes podem também afetar a via 5-LO, e a expressão de 5-LO e FLAP pode ser controlada por moléculas específicas. Por exemplo, foi descrito que citocinas derivadas da resposta Th2, IL-4 e IL-13, inibiram a formação de leucotrienos em monócitos por decréscimo nos níveis da proteína e mRNA para FLAP, enquanto IL-1 e IFN- γ (citocinas Th1) estimulariam a expressão de 5-LO (revisto em NASSAR et al., 1997). A atividade de 5-LO pode também ser modulada por NO, já que sob exposição prolongada a lipopolissacarídeo (LPS), há inibição do metabolismo da 5-LO em macrófagos, por indução da iNOS (COFFEY et al., 2000). O mecanismo regulatório da via 5-LO parece ser complexo e é dependente do tipo celular e de suas atividades funcionais.

1.2.2. Mediadores lipídicos durante a infecção

O papel dos mediadores lipídicos, como as prostaglandinas, durante a infecção por *Trypanosoma cruzi* tem sido bem estudado. Grande quantidade de PGE₂, TNF- α e NO são produzidos durante a infecção pelo parasita (BORGES et al., 1998; PINGE-FILHO et al., 1999; MICHELIN et al., 2005). Trabalhos recentes mostram que o bloqueio da COX em animais infectados com *T. cruzi*, leva a uma inibição da iNOS (CIESLIK et al., 2002; MOON et al., 2004). O bloqueio da síntese de PG reverte a inabilidade proliferativa de células esplênicas de animais infectados e aumenta a sobrevivência dos animais. A inibição de PGs reduziram a síntese de NO, indicando o envolvimento do NO no efeito imunossupressivo das PGs (MICHELIN et al., 2005) e produção de citocinas na infecção por *T. cruzi* (PINGE-FILHO et al., 1999).

Mais recentemente foi mostrado que mediadores lipídicos como a LTB₄ e PAF podem também participar de uma cascata de eventos levando macrófagos infectados para a produção de NO e destruição do parasito. Foi demonstrado que LTB₄ e PAF são capazes de potencializar a produção de NO em macrófagos peritoneais inflamatórios induzidos pelo tioglicolato e infectados com *T. cruzi*. Ainda a o LTB₄ potencializa o IFN- γ para produção de NO neste modelo e atividade potencializadora do LTB₄ na capacidade induzir produção de NO, foi revertido pelo pré-tratamento dos macrófagos com antagonista de receptor para LTB₄, (CP-105,696), bem como antagonista do receptor de PAF (UK-74,505) e anticorpos monoclonais anti TNF- α , indicando que o efeito potencializador do LTB₄ na indução de NO e destruição do parasito seria via produção de PAF e TNF- α . Foi mostrado também que o LTB₄ é capaz de estimular macrófagos peritoneais residentes para atividade tripanocida, que é inibido pela presença concomitante de CP-105,696, UK-74,505 ou ambos. No entanto, o CP-105,696 e o UK-74,505, não inibem a capacidade tripanocida mediada pelo IFN- γ . *In vivo*, o tratamento de animais infectados com antagonistas do receptor LTB₄, (CP-105,696), aumenta a parasitemia, mas, afeta pouco a sobrevivência dos animais (TALVANI et al., 2002).

O LTB₄ é um mediador pró-inflamatório que ativam leucócitos polimorfonucleares, com isso alterando sua forma e promovendo sua ligação ao endotélio pela indução da expressão de moléculas de adesão. A firme adesão dos leucócitos no endotélio microvascular é dependente da expressão de moléculas de adesão como as β_2 -integrinas (CD18), que são expressas na superfície dos leucócitos, permitindo a sua adesão para uma variedade de tipos celulares que expressam um ou mais ligantes, pertencentes à superfamília das imunoglobulinas e denominados de moléculas

de adesão intercelular (ICAM-1 a 5) (BAILLY et al., 1995; GHAMBERG, 1997; TIAN et al., 1997). Animais deficientes de ICAM-1 infectados com *T. cruzi* apresentaram um reduzido infiltrado inflamatório tanto no coração como no músculo esquelético, associados à diminuição no número de células T CD4⁺ e CD8⁺ (MICHAILOWSKY et al., 2004).

Recentemente, foi proposto um novo mecanismo para a regulação da produção de IL-12 envolvendo LXA₄ (lipoxina A₄), um mediador eicosanóide dependente da via da 5-LO. Foi observado que a susceptibilidade de camundongos ao *Toxoplasma gondii* estava associada com a expressão reduzida de CCR5 pelas células dendríticas, um fenômeno dependente da enzima 5-LO e crítica para geração de LXA₄ (ALIBERTI et al., 2002a). Em outro estudo, Aliberti e colaboradores (2002b) demonstraram que camundongos 5-LOko, não produtores de LXA₄, infectados por *T. gondii* morrem mais precocemente e apresentam severa encefalite, enquanto que, camundongos selvagens infectados que produzem grandes quantidades de LXA₄ desde o início da infecção cronicam sem a presença de patologia severa. Verificaram ainda que a susceptibilidade dos animais 5-LOko estava associada ao significativo aumento nos níveis de IL-12 e IFN- γ . O tratamento com um análogo sintético de LXA₄ tornaram os camundongos resistentes e atenuaram a patologia.

Ademais, no modelo de infecção aguda por *Mycobacterium tuberculosis*, a produção de LXA₄ em camundongos selvagens modulou a resposta protetora Th1. Enquanto que, animais 5LOko infectados, que não produzem a LXA₄, apresentaram maior resistência à infecção, que foi atribuída aos níveis elevados de IL-12 e IFN- γ presentes nestes animais. A administração do análogo de LXA₄ em animais 5LOko infectados, aboliu a sua resistência ao patógeno (BAFICA et al., 2005).

Na peritonite induzida pela ligadura e perfuração do intestino em camundongos 5-LOko, foi verificado que estes animais apresentam redução no acúmulo de neutrófilos peritoneais e um aumento no número de bactérias na cavidade peritoneal, com um aumento na sobrevida (BENJAMIM et al., 2005)., Embora tenha ocorrido um aumento no número de bactérias no peritônio, o aumento de sobrevida também foi observado em animais selvagens tratados com o inibidor da síntese de leucotrienos, MK886 ou quando tratados com antagonista do receptor de CisLTs, MK571, mas não quando tratados com antagonista do receptor de LTB₄, CP105, 696. A proteção nos camundongos 5-LOko foi associada com a diminuição da permeabilidade vascular e níveis de lactato reduzidos no soro. Além disso, camundongos selvagens tratados com MK571

exibiram menor hipotensão induzida pela sepse. Estes dados demonstraram o efeito protetor dos CysLTs na resposta imune local e o efeito exacerbador nas alterações hemodinâmicas causada pela sepse.

Em outro estudo de endotoxemia induzida por endotoxina de *Escherichia coli*, foi observado o papel dos leucotrienos na vasoconstrição pulmonar hipóxica (HPV), que leva a uma redução da oxigenação sistêmica. Animais 5LOko apresentaram atenuação da HPV, redução do infiltrado inflamatório pulmonar e diminuição na lesão dos capilares alveolares. Camundongos selvagens tratados com inibidor de síntese de leucotrienos, MK886 ou antagonista de receptor para CisLTs, MK571, antes da administração da endotoxina, tiveram a HPV atenuada e a injúria pulmonar reduzida, mas não houve redução nos níveis de mieloperoxidase nos pulmões. Estes resultados demonstram que metabólitos da 5-LO, principalmente Cis-LT, seriam relevantes na indução de HPV e a lesão pulmonar (ICHINOSE et al., 2001).

A fibrose pulmonar é uma doença, na qual são verificados níveis bastante elevados de metabólitos gerados pela 5-LO, como CisLTs. Usando como modelo a indução de fibrose por bleomicina em camundongos 5-LOko, foi verificado que estes animais são mais resistentes a doença quando comparados aos animais selvagens. Os animais 5-LOko apresentam menor infiltrado inflamatório, menor deposição de colágeno e redução nos níveis de hidroxiprolina. Ainda, a análise *in situ* de células do lavado pulmonar indicou a presença aumentada de fatores anti-fibróticos, PGE₂ e aumento nos níveis de IFN- γ . (PETERS-GOLDEN et al., 2002).

No modelo de pneumonia pela infecção intratraqueal da bactéria gram negativa, *Klebsiella pneumoniae*, em camundongos, foi observado que a infecção leva a um aumento dos níveis de leucotrienos e presença de neutrófilos nos pulmões. Ao contrário, animais 5-LOko são extremamente susceptíveis e apresentam bacteremia e aumento na mortalidade, sem a diminuição no infiltrado neutrofílico. A análise de macrófagos alveolares provenientes de animais 5-LOko, mostrou sua menor capacidade fagocítica e bactericida, que é revertido pelo tratamento com LTB₄, indicando que leucotrienos endógenos são extremamente importantes para o combate de bactérias causadoras de pneumonia (BAILIE et al., 1996).

Em modelo de infecção por *Strongyloides venezuelensis*, um modelo Th2, o tratamento com o inibidor de síntese de leucotrienos MK886 ou a infecção em animais 5LOko, tornaram os animais susceptíveis à infecção e apresentaram um número elevado de ovos do parasita nas fezes, quando comparados aos animais controles. Os animais tratados farmacologicamente seriam

deficientes de LTB₄, mas não de LTC₄. A susceptibilidade a infecção em animais deficientes de LTB₄ está associada à redução no número de eosinófilos e células mononucleares no sangue, cavidade peritoneal e lavado bronco alveolar, a um aumento de IFN-γ na fase inicial e IL-12 produzido por células esplênicas em fases mais tardias da infecção e a redução nos níveis séricos de IgE e IgG1 (MACHADO et al, 2005).

Em estudo de malária cerebral pela infecção com *Plasmodium berghei* ANKA, os camundongos infectados morrem entre 6-17 dias p.i, sendo que, após o tratamento com aspirina, todos os animais morrem antes do 12º dia de infecção. As análises de mRNA demonstraram que animais infectados apresentam aumento na expressão do gene para PLA₂, COX-1 e COX-2 no cérebro e níveis aumentados de LTB₄ no soro. Já os animais infectados tratados com aspirina apresentam níveis muito mais elevados de LTB₄, quando comparados aos animais controles infectados. Esses dados sugerem que as PGs são protetoras e os LTs exacerbadores da doença (XIAO et al., 1999).

Finalmente, ao se estudar camundongos susceptíveis (BALB/c), resistentes (C3H/HePAS) e camundongos 5-LOko infectados com *Leishmania amazonensis*, foi demonstrado que a deficiência de LTs induzida farmacologicamente (U57302) ou geneticamente (5-LOko) inibe a atividade Leishmanicida dos macrófagos peritoneais via BLT1 e, que, o tratamento com LTB₄ em macrófagos de animais 5-LOko, reverte à inibição, tornando os macrófagos funcionais para matar o parasita. Ainda foi verificado que animais resistentes, quando infectados, produzem mais LTB₄, comparados aos níveis produzidos por animais susceptíveis infectados. E, animais infectados deficientes de LTs apresentam edema de pata maior após o desafio com injeção s.c de formas promastigotas, indicando que são mais susceptíveis que os animais controles (SEREZANI et al., 2006)

Os resultados discrepantes sobre o papel dos leucotrienos nos diferentes modelos de infecção por protozoários nos encorajaram a investigar o papel dos leucotrienos na fase aguda de infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*, pois acreditamos que poderá trazer informações relevantes para o melhor entendimento da participação destes mediadores nas infecções e na modulação de células da resposta imune.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais:

Verificar o papel dos leucotrienos na susceptibilidade ou resistência de camundongos durante a infecção aguda experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. Para tanto, pretendemos avaliar o parasitismo, sobrevivência e analisar vários parâmetros imunológicos em camundongos 129/Sv e camundongos deficientes de leucotrienos (129-*Alox5^{tm1Fun}*/Sv ou 5-LOko).

2.2. Objetivos específicos:

- 1- Analisar a produção de prostaglandinas e leucotrienos durante a fase aguda de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*;
- 2- Analisar a parasitemia e mortalidade dos camundongos;
- 3- Verificar o parasitismo tissular e o grau de infiltrado inflamatório no miocárdio, fígado e músculo esquelético;
- 4- Analisar o fenótipo dos leucócitos no baço;
- 5- Verificar a produção das diferentes citocinas pelas células do baço de animais infectados;
- 6- Analisar os níveis séricos de anticorpos específicos para o parasito;
- 7- Analisar os níveis séricos de metabólitos do óxido nítrico;
- 8- Avaliar a atividade tripanocida de animais infectados.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Neste trabalho, foram utilizados camundongos da linhagem 129/Sv e camundongos 129-*Alox5^{tm1Fun}*/Sv, “knockout” em 5-Lipoxigenase (5-LOko), machos com 4-6 semanas de idade. As matrizes foram adquiridas da JAX Mice (ME, USA). Os animais foram criados no Biotério de Animais isogênicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, e gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas – FCFRP/USP. Durante todo o período de experimentação os animais foram mantidos em condições livres de germes específicos (SPF) no Biotério de Animais de Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais e pela Comissão de Biossegurança da FCFRP/USP (**Anexos A e B**).

3.2. Infecção

Os camundongos foram infectados intraperitonealmente com 200 formas tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*, diluídas em 200 µL de PBS (tampão salina fosfato). Para a realização da curva de parasitemia e sobrevivência foram utilizados grupos de 10-20 animais. Para os demais experimentos foram utilizados 5-10 animais por grupo experimental. Em todos os experimentos os animais controles foram injetados com 200 µL de PBS pela via i.p.

3.3. Parasitemia e Mortalidade

A contagem de parasitas circulantes foi avaliada pelo exame de sangue a fresco (5µL), obtida pela secção da cauda do animal. A determinação do número de parasitas por mililitro de sangue foi calculada pelo Método de Brener (BRENER et al.,1969). A mortalidade dos animais infectados foi determinada através da observação diária dos animais durante o período de infecção. Foram utilizados 10-20 animais por grupo experimental.

3.4. Histopatologia

Os animais infectados dos diferentes grupos experimentais foram sacrificados em câmara de CO₂ 5, 12, 16 e 19 dias após a infecção por *T. cruzi*. Amostras de coração, músculo

esquelético e fígado foram fixadas em formalina tamponada a 10%. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em álcool 70%, clarificadas em xilol e incluídas em blocos de parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram feitos com auxílio de um micrótomo. Os cortes foram dispostos em lâminas e incubados a 59-60°C para fixação. Em seguida, foram lavados em xilol para retirar o excesso de parafina e reidratados com concentrações decrescentes de álcool, do absoluto ao 80%. Os cortes reidratados foram lavados em água e corados com hematoxilina e eosina (H & E). Posteriormente, foram desidratados com concentrações crescentes de álcool, lavados com xilol e as lâminas recobertas com lamínulas (MICHAILOWSKY et al., 2004). Ninhos de amastigotas foram contados em cortes longitudinais em aumento de 400x, sendo que para cada amostra tecidual foram observados 100 campos microscópicos (MALDONADO et al., 2004).

3.5. Dosagem de NO_x (NO₂/NO₃)

Para determinar os níveis de NO_x *in vivo*, o sangue foi coletado antes de sacrificar os animais dos diferentes grupos de amostragem. O sangue foi colhido pelo plexo orbital com auxílio de pipetas pasteur. Os soros foram obtidos por centrifugação e tratados com nitrato redutase para a conversão de NO₃ a NO₂ e o NO_x foi medido através da reação de Griess (GILLIAM et al., 1993; VESPA, et al., 1994).

3.6. Obtenção de células da cavidade peritoneal e obtenção dos sobrenadantes para dosagem dos leucotrienos

A cavidade peritoneal foi lavada com PBS gelado (5 mL por animal) contendo 1,25% de citrato de sódio a 0,4 g/mL e centrifugadas a 180 g por 10 min a 4°C. As células foram resuspendidas (1x10⁶ células/mL) em HBSS contendo Ca²⁺-Mg²⁺ e então estimuladas com ionóforo de cálcio A23187 (0,5 µM) por 15 min. A reação foi parada no gelo e as amostras foram centrifugadas a 180 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e LTB₄ e LTC₄ foram medidos por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).

3.7. Dosagem de leucotrienos

As amostras de sobrenadantes foram determinadas em triplicata, enquanto a curva padrão de leucotrienos B₄ e C₄ (0 a 40 pg/mL), o branco (B) e o branco para ligações inespecíficas (NSB) foram realizadas em duplicata. Utilizou-se 100 µL de tampão de reação (tampão fosfato 100 mM pH 7,5; cloreto de sódio 0,9%; BSA 0,1% e solução conservante 0,05%) nas análises de NSB e 50 µL nas análises das amostras, B e curva padrão. Foram utilizados 50 µL da solução de anticorpos primários (anti-leucotrieno B₄ ou C₄), exceto nas análises de NSB e B. Em seguida a reação foi incubada a temperatura ambiente por 2 horas em agitador orbital. Posteriormente, adicionou-se 50 µL da solução contendo anticorpos anti-leucotrieno B₄ ou C₄ conjugados à enzima peroxidase e a reação foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. Após a incubação a reação foi aspirada e a placa foi lavada 4 vezes com 300 µL/poço de tampão de lavagem (tampão fosfato 10 mM pH 7,5 e Tween-20 0,05%). Foi adicionado, imediatamente, 150 µL da solução contendo o substrato enzimático (tetrametilbenzidina /peróxido de hidrogênio) e a reação foi incubada exatamente por 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação. A reação foi parada com adição de 100 µL/poço de ácido sulfúrico 1 M e a densidade ótica final foi determinada a 450 nm.

3.8. Obtenção de células esplênicas

Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e os baços removidos cirurgicamente. Os esplenócitos foram obtidos por divulsão do baço em peneiras de aço inox com porosidade de 0,01mm em 4 mL de meio RPMI 1640 (GibcoBR). Em seguida, as células foram lavadas por três vezes à 180 g durante 15 minutos a 10°C, ressuspensas em 10 mL de meio RPMI, contadas e utilizadas para fins experimentais (NOMIZO et al., 2005).

3.9. Obtenção de sobrenadantes de cultura celular

Preparações de células esplênicas dos diferentes grupos experimentais obtidas conforme descrito acima foram ressuspensas a uma concentração de 10×10^6 células/mL em meio completo RPMI-1640 (Sigma Chemical Company, St. Louis) suplementado com 10% SBF (Gibco, Brasil), 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol (2-ME; Sigma Chemical Company, St. Louis), 20 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Company, St. Louis) e 20 µg/mL de sulfato de gentamicina

(Shering-Plough, Rio de Janeiro) [RPMI-C]. Para a obtenção dos sobrenadantes de cultura, as células esplênicas foram acondicionadas em placas estéreis de 24 poços, na concentração de 5×10^6 células/mL/poço. As placas foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ em ar. Os sobrenadantes foram colhidos após 24 e 48 horas de incubação e mantidos a -70°C para posterior análise de presença de citocinas (NOMIZO et al., 2005).

3.10. Quantificação de citocinas por ELISA

A presença de citocinas foi avaliada através de ensaio imunoenzimático tipo sanduíche. Previamente placas de 96 poços com alta afinidade para proteínas, (Maxisorp, Nunc), foram sensibilizadas com 50 µL/poço, na diluição sugerida pelo fabricante, com anticorpos captura para IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-12, IL-10 e IFN-γ por 16 horas a 4°C. Todos os mAbs utilizados na sensibilização foram adquiridos da Pharmingen, CA. Após a sensibilização, as placas foram bloqueadas por 1 hora à temperatura ambiente com PBS acrescido de 1% (p/v) de BSA (200 µL/poço) e depois lavadas por seis vezes com PBS acrescido de 0,05% (v/v) de Tween₂₀ (PBS-T), em Auto Strip Washer. Em seguida, 50 µL dos sobrenadantes de cultura ou as citocinas recombinantes padrão (Pharmingen) foram adicionadas aos poços e incubadas por 16 horas a 4°C. As placas foram lavadas quatro vezes (200 µL/poço) com PBS-T e incubadas com 50 µL/poço dos respectivos anticorpos de detecção biotinilados (Pharmingen) diluídos em PBS-T e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. As placas lavadas por 4 vezes com PBS-T e 50 µL de avidina conjugada à peroxidase diluída 1/500 em PBS-T foram adicionados aos poços e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, após seis lavagens com PBS-T, a reação foi revelada com a adição de 50 µL de tampão de revelação (0,5 mg/mL de Ortofenilenodiamino (OPD), diluído em tampão citrato, pH 5,0 contendo 0,05% de H₂O₂). Após aproximadamente de 15 minutos a reação foi interrompida adicionando-se aos poços 50 µL de ácido sulfúrico 4N. A leitura das absorvâncias foi medida a 492 nm em leitor de ELISA (ELx50 – Bio-Tek Instruments, INC., Winooski, VT). A quantificação de citocinas nos sobrenadantes foi determinada através de obtenção de curva padrão, utilizando citocinas recombinantes com concentrações sabidamente conhecidas.

3.11. Análise fenotípica das populações celulares por citofluorimetria de Fluxo

Os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com PE (r-ficoeritrina), FITC (isotiocianato de fluoresceína) e PerCP (proteína peridina clorofil) foram utilizados nos experimentos: [H129.19 (anti-CD4), 53-6.7 (anti-CD8), MB19-1 (anti-CD19), 7D4 (anti-CD25), KM114 (anti-CD44), H1.2F3 (anti-CD69), RB6-8C5 (anti-GR-1), CI:A3-1 (anti-F4/80), M1/70 (anti-CD11b), HL3 (anti-CD11c)]. Todos os reagentes utilizados na imunofenotipagem foram adquiridos da BD-Pharmingen, CA, com exceção do anticorpo para F4/80 adquirido da Serotech, Raleigh, NC. A marcação das células foi realizado seguindo o protocolo descrito anteriormente (Nomizo et al., 2006). Os esplenócitos foram ressuspensos a uma concentração de 1×10^7 células/mL em PBS contendo 1% de soro bovino fetal e 0,1% de azida sódica (Tampão de FACS). Em seguida, alíquotas de 200 μ L de células foram colocadas nos poços em placas de 24 poços, fundo em U, centrifugadas por 2000 rpm durante 15 segundos e o sobrenadante descartado. O “pellet” de células foi desfeito após agitação e as células incubadas com 30 μ L de Fc-block (BD-Pharmingen, CA), na diluição 1/500 em tampão de FACS, por 30 minutos a 4°C. Ao findar da incubação, as células foram centrifugadas 2000 rpm durante 15 segundos e o sobrenadante descartado. Em seguida, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais relevantes conjugados com PE, FITC, e PerCP diluídos em tampão de FACS conforme sugerido pelo fabricante, incubadas por 30 minutos a 4°C protegidos da luz e lavadas três vezes com 200 μ L de tampão de FACS a 2000 rpm durante 15 segundos. As células foram então lavadas três vezes em 200 μ L de tampão de FACS e ressuspensas em 0,5 mL de PBS/2% SBF/0,1% Azida Sódica. Finalmente, as células foram submetidas a leitura no citômetro de fluxo [FACSCanto - Becton Dickinson, Sunnyvale, CA] sendo analisadas 20.000 células, utilizando os detectores e canais adequados para a leitura de cada fluorocromo. As análises dos resultados foram realizadas em software DIVA – BD.

3.12. Obtenção de tripomastigotas de *T. cruzi*

A obtenção de formas tripomastigotas em células LLCMK2 (monkey kidney fibroblast cell line) foi realizada conforme descrito anteriormente (MICHELIN et al., 2005). As células foram cultivadas em meio RPMI-C em estufa de CO₂, a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até obter-se uma cultura uniforme e confluenta. O sangue de animais infectados foi coletado por punção cardíaca e centrifugado a 1000 rpm por 15 min a 10°C para obtenção do plasma.

Terminada a centrifugação, todo o material foi colocado em estufa a 37° por 30 min para que as formas tripomastigotas migrem para o plasma. O plasma foi retirado e colocado nas garrafas de cultura das células LLCMK2. O meio de cultivo foi trocado a cada 2 dias. Após 10 dias obteve-se uma maior liberação dos tripomastigotas pelas células. O meio contendo os tripomastigotas foi retirado e centrifugado 3 vezes a 1000 rpm por 15 min a 10°C e o “pellet” descartado. Ao findar da terceira centrifugação o tubo foi colocado em estufa a 37° por 30 min para que as formas tripomastigotas migrem para o sobrenadante. Cuidadosamente o sobrenadante foi colhido e centrifugado a 3000 rpm a 4°C por 5 min para sedimentar os tripomastigotas. O sobrenadante foi descartado e os parasitos ressuspensos em meio RPMI-C, contados e utilizados nos experimentos.

3.13. Avaliação da adesão/invasão de tripomastigotas e atividade tripanocida de células peritoneais aderentes

3.13.1. Avaliação da adesão/invasão de tripomastigotas de *T. cruzi*

As células da cavidade peritoneal de animais 129 ou 129 – 5LOko foram obtidas pela injeção de 5 mL de meio RPMI. O exsudato foi retirado com auxílio de agulha e seringa, colocadas em tubos plásticos de 50mL e lavadas 2 vezes a 1000 rpm por 15 min a 10°C. Ao final da segunda lavagem as células foram ressuspensas em meio RPMI-C e contadas. 1×10^6 células/mL foram distribuídas em placa de 24 poços sob lamínulas de 13 mm e incubadas em estufa de CO₂ por 2-4 h a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Ao findar do período de incubação, as células não-aderentes foram removidas lavando 5 vezes os poços com meio RPMI. 1mL de meio RPMI-C foram colocados nos poços contendo células aderentes. As células foram estimuladas com IFN- γ (5 ng/mL) e LPS (0,1 μ g/mL) por 1 h. Após a incubação, o conteúdo do poço foi retirado e alguns poços (4 para cada grupo experimental) foram incubados com 2 mM de L-NAME (éster de metil N-nitro-l-arginina) ou meio. A placa foi incubada por 30 minutos (JACOB SET al., 1998). Ao final da incubação, as formas tripomastigotas (~1M ϕ :Parasito) foram colocados nos poços e incubadas por mais 2,5 h (TALVANI et al., 2002). Após este tempo, os tripomastigotas não associados aos macrófagos foram retirados por sucessivas lavagens com meio RPMI. Ao final da ultima lavagem, foi adicionado metanol absoluto sobre as lamínulas por 5 min. As lamínulas foram retiradas dos poços, secadas e coradas com corante panótico, secadas e montadas em lâmina de microscópio. A análise foi realizada contando o número de

tripomastigotas associados e internalizados em 200 macrófagos/lamina (WIRTH & KIERSZENBAUM, 1985).

3.12.2. Capacidade tripanocida dos macrófagos peritoneais

As células aderentes estimuladas com IFN- γ (5 ng/mL) e LPS (0,1 μ g/mL), tratadas ou não com 2 mM de L-NAME (éster de metil N-nitro-l-arginina) ou meio foram incubadas na presença formas tripomastigotas (~1M ϕ :2Parasito) e incubadas por 2-4 horas. Os poços foram lavados 5 vezes em meio RPMI-C e as placas incubadas por 5 dias em estufa de CO₂, a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Diariamente os sobrenadantes foram colhidos e meio novo adicionado aos poços. Os sobrenadantes foram centrifugados a 3000 rpm a 4°C por 5 minutos. Ao final da centrifugação o sobrenadante foi removido cuidadosamente e o “pellet” ressuspensos em 50 μ L de meio RPMI e contados em câmara de Newbauer.

3.15. Produção de antígenos de *T. cruzi*

As formas tripomastigotas obtidas de células LLCMK2 foram lavadas 5 vezes em PBS a 3000 rpm a 4°C por 5 minutos. Após a última centrifugação dos parasitos. O sobrenadante foi desprezado e os parasitos ressuspensos em 1-1,5 mL de PBS, e submetidos a lise por congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento por 6 vezes. Em seguida os parasitos lisados foram sonicados (20 KHz; 30 Watts por 2 minuto). O tubo foi centrifugado a 15000 g por 15 min. O sobrenadante foi retirado e filtrado em membrana de poro 0,45 μ m. O produto da filtração foi congelado a -70°. Após vários processos de obtenção de frações solúveis do parasito, foi feito um “pool” das diferentes extrações e a quantidade de proteínas dosadas pelo método de Bradford (1976). Alíquotas do antígeno foram congeladas para posterior uso em experimentos (MARTIN & TARLETON, 2005; MARCIPAR et al. (2003).

3.16. Determinação de anticorpos específicos contra *T. cruzi*

A avaliação dos níveis de anticorpos foi realizada método imunoenzimático indireto. Assim, placas de poliestireno com fundo chato (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas com 10 μ g de Ag de *T. cruzi* em um volume de 100 μ L/orifício e incubadas por 12 horas a 4°C em PBS pH 8.0. Em seguida, efetuou-se o bloqueio dos sítios remanescentes com 200 μ L/poço de PBS com 5% de caseína (PBS-C). A placa foi incubada por 1

hora a temperatura ambiente. Após o bloqueio, o conteúdo dos poços removidos pela inversão da placa e os soros de camundongos dos diferentes grupos experimentais foram diluídos seriamente em 50µL de PBS-C contendo 0,05% (v/v) de Tween₂₀ PBS-CT e incubadas por 2 horas a 37°C. As placas foram submetidas a cinco lavagens com PBS-T (200 µl/poço) em Auto Strip Washer. Em seguida, 50 µl de anticorpo anti-IgG ou anti-IgG2a ou anti-IgG1 de camundongo biotilado (Pharmingen, San Diego, CA, USA) diluído 1/500 em PBS-T foram adicionados aos respectivos poços. Após 1 hora de incubação à 37°C, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T (200 µl/poço). Em seguida 50 µl de avidina conjugada à peroxidase (Sigma) diluídas 1/400 em PBS-T, foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas por mais 30 minutos a 37°C. Por fim, as placas foram submetidas a mais cinco lavagens com PBS-T (200 µl/poço). A reação foi revelada com adição de 50 µl/poço de solução de 0,4 mg/ml (p/v) de orto-fenilenodiamina (OPD, Sigma), diluída em tampão citrato (citrato de sódio 100 mM e fosfato de sódio monobásico 100 mM, acrescido de 0,03% (v/v) de água oxigenada 30 volume. Após incubação por ~5-10 minutos em câmara escura, a reação foi interrompida com a adição de 50 µl/poço de ácido sulfúrico 4,0 N (Reagen, RJ). As leituras das absorvâncias foi medida a 492 nm, em leitor de ELISA (ELx50, Bio-Tek Instruments, INC., Winooski, VT).

3.17. Análises estatísticas

Os resultados foram analisados pelo teste t Student, usando o software GrafPad Prism 4.02. Para citocinas foi utilizado o teste Kruskal-Wallis não paramétrico. Foi considerado como significantes valores de $p \leq 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Quantificação de Prostaglandinas e Leucotrienos produzidas por células do lavado peritoneal de camundongos 129 e camundongos 129 5-LOko infectados com cepa Colombiana de *T. cruzi*.

Os nossos resultados indicam que células do lavado peritoneal produzem LTB₄ (**Figura 2A**) e PGE₂ (**Figura 2B**) durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* (cepa Colombiana) em animais 129. Verificamos que a produção de LTB₄ aumenta gradativamente no decorrer da infecção, sendo que a maior produção deste mediador ocorreu no 19º dia de infecção e depois sua produção reduz drasticamente como o observado no 26º dia pós-infecção (**Figura 2A**). Em relação a PGE₂, diferentemente ao observado para a cinética de produção do LTB₄, este mediador é produzido em maiores quantidades no 12º dia de infecção e à medida que a infecção avança, seus níveis caem, como o observado no 19º dia de infecção e volta a aumentar (embora em menores níveis aos verificados no 12º dia de infecção) ao 26º dia de infecção (**Figura 2B**). É importante ressaltar que nossos resultados indicam também que a PGE₂ é o mediador lipídico produzido em maiores quantidades durante a fase aguda de infecção por *T. cruzi*. Ademais, foi verificado que células peritoneais provenientes de camundongos 129 com 19 dias de infecção também são capazes de produzir LTC₄ (**Figura 2C**). Como esperado, animais 129 5-LOko infectados não produziram LTB₄ (**Figura 2A**) e LTC₄ (**Figura 2C**). Mais ainda, foi verificado que animais 129 5-LOko infectados produzem menores quantidades de PGE₂ na fase inicial de infecção comparados aos produzidos por animais controles infectados, e, embora aumentem a capacidade para produção de PGE₂ (níveis semelhantes aos animais controles infectados com 5 dias de infecção) em fases subseqüentes da infecção, não apresentam flutuação para a produção deste mediador lipídico no período analisado.

Figura 2. Dosagem de LTB₄, PGE₂ e LTC₄ produzidas por células do lavado peritoneal de animais infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. A – LTB₄; B – PGE₂; C – LTC₄. 10⁶ células do lavado peritoneal foram tratadas com ionóforo de cálcio, os sobrenadantes coletados e analisados quanto à presença de mediadores lipídicos. Os níveis de LTB₄ e PGE₂ foram analisados em amostras celulares coletadas com 5, 12, 19 e 26 dias de infecção (n=3, por grupo experimental), sendo que para a dosagem de LTC₄ foram utilizadas amostras do 19º dia de infecção, quando se observou maiores níveis de LTB₄. A figura representa os dados de um experimento de dois realizados com resultados semelhantes. *grupo infectado vs. grupo controle; #grupo 5-LOko infectado vs. grupo 129 infectado; (p<0,05) A linha tracejada representa o limite de detecção do método utilizado.

4.2. Avaliação do número de parasitas circulantes (parasitemia) em camundongos 129 e camundongos 129 5-LOko infectados com cepa Colombiana de *T. cruzi*.

Os resultados expressos na **Figura 3** indicam que camundongos 129 e 129 5-LOko infectados com *T. cruzi* apresentam diferenças quanto à presença de parasitas circulantes. Animais 129 apresentaram níveis detectáveis de parasitas circulantes a partir do 19º dia e picos de parasitemia no 10º e 20º dias após a infecção, enquanto que animais 5-LOko apresentaram parasitas circulantes após o 11º dia e um único pico após 12 dias de infecção. Foi verificado

também que animais 5-LOko apresentam significativamente, menor quantidade de parasitas circulantes entre os dias 16 e 22 de infecção, quando comparados aos números de parasitas verificados em camundongos 129.

Figura 3. Curva de parasitemia em camundongos 129 e 5-LOko infectados com a cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*. Camundongos das linhagens 129 e 5-LOko (n=10) foram infectados intraperitonealmente com 200 formas tripomastigotas e a contagem do número de parasitas sangüíneos foi realizado conforme descrito no item 3.3. A figura representa os dados de um experimento de dois realizados com resultados semelhantes. # p<0,05.

4.3. Avaliação da sobrevivência camundongos 129 e camundongos 129 5-LOko durante a fase aguda de infecção pelo *T. cruzi*.

Quanto à mortalidade dos animais, observamos que animais 129 infectados começaram a morrer mais tardiamente (18º dia pós-infecção) que os animais 5-LOko (16º dia pós-infecção) (**Figura 4**). Mais ainda, animais 129 infectados morreram gradativamente, sendo que 30 dias após infecção, somente 30% de animais 129 permaneceram vivos (**Figura 4**). Ao contrário, apesar de 20% dos animais 5-LOko terem morrido mais precocemente quando comparados aos animais 129 infectados, foi verificado que 80% dos animais 5-LOko sobrevivem até o 30º dia após infecção.

Figura 4. Porcentagem de sobrevivência de camundongos 129 e camundongos 129 5-LOko infectados com *Trypanosoma cruzi*. A porcentagem de sobrevivência foi analisada pelo acompanhamento diário dos animais (n=10). A figura representa os dados de um experimento de dois realizados com resultados semelhantes. (129 infectado Vs. 129 5-LOko infectado, # P<0,001)

4.4. Histopatologia do coração, músculo esquelético e fígado de camundongos 129 e 129 5-LOko infectados com *T. cruzi*.

A análise dos cortes histológicos de musculatura cardíaca (**Figura 5**) e esquelética (**Figura 6**), após 16 dias de infecção indica que animais 129 infectados com *T. cruzi* apresentaram maior parasitismo tecidual, com maior número de ninhos de amastigotas (setas indicativas), bem como, um maior infiltrado inflamatório predominantemente composto de células mononucleares, quando comparados as amostras obtidas de animais 5-LOko infectados. O infiltrado inflamatório intenso no coração de camundongos controles, mas não em camundongos 5-LOko foram verificados após 19 dias de infecção (**Figura 8**) Os dados referentes ao menor parasitismo em musculatura esquelética e cardíaca foram confirmados pela contagem dos ninhos de amastigotas (**Tabela 1**). Ao verificar cortes histológicos do fígado (**Figura 7**), observou-se que tanto cortes provenientes de animais 129 infectados como 5-LOko infectados, apesar de apresentarem um pequeno infiltrado de células mononucleares, não apresentaram a presença de parasitas.

Figura 5. Cortes histológicos do coração de camundongos após 16 dias de infecção. A – camundongo 129 controle; B – camundongo 129 infectado; C – camundongo 5-LO^{-/-} controle; D – camundongo 5-LO^{-/-} infectado. Os cortes histológicos foram feitos conforme metodologia citada no item 3.5.

Figura 6. Cortes histológicos do músculo esquelético de camundongos após 16 dias de infecção. A – camundongo 129 controle; B – camundongo 129 infectado; C – camundongo 5-LOko controle; D – camundongo 5-LOko infectado. Os cortes histológicos foram feitos conforme metodologia citada no item 3.5.

Figura 7. Cortes histológicos do fígado de camundongos após 16 dias de infecção. A – camundongo 129 controle; B – camundongo 129 infectado; C – camundongo 5-LOko controle; D – camundongo 5-LOko infectado. Os cortes histológicos foram feitos conforme metodologia citada no item 3.5.

tela 1. Determinação do número de ninhos de amastigotas em coração, fígado e músculo esquelético de camundongos 129 e 5-LOko infectados com a Cepa Colombiana de Trypanosoma cruzi.

Grupo experimental	Coração	Fígado	Músculo esquelético
129	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
129 ^{-/-}	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
5-LOko	17,00 ± 4,24	0 ± 0	0 ± 0
5-LOko ^{-/-}	1,50 ± 2,12 #	0 ± 0	0 ± 0
129	119,67 ± 4,7	0 ± 0	3,67 ± 2,52
129 ^{-/-}	7,33 ± 3,215	0 ± 0	0,67 ± 0,58 #
5-LOko	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
5-LOko ^{-/-}	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Os dados da tabela mostram a média dos ninhos ± SD da contagem de 100 campos por lâmina (n=3). (129 infectado vs. 129 5-LOko infectado, # P<0,001)

Figura 8. Cortes histológicos do coração de camundongos após 19 dias de infecção. A – camundongo 129 controle; B – camundongo 129 infectado; C – camundongo 5-LOko controle; D – camundongo 5-LOko infectado. Os cortes histológicos foram feitos conforme metodologia citada no item 3.5.

4.4. Quantificação de citocinas produzidas por células esplênicas de camundongos 129 e 5-LOko infectados com *T. cruzi*.

As análises de citocinas mostraram que células esplênicas de camundongos 5-LOko produzem níveis detectáveis de IL-1 e IL-6 na fase inicial da infecção (5° dia), fato não verificado em camundongos 129 infectados (**Figura 9A e 9B**). Com o decorrer da infecção (12° dia após a infecção) esplenócitos de camundongos 129 e 5-LOko aumentam drasticamente a capacidade para produção de IL-1 e IL-6. Embora nossos dados mostrem que não há diferença significativa para produção de IL-1 entre os grupos experimentais, o mesmo não ocorre em relação a IL-6, onde nossos dados indicam que células provenientes de animais 5-LOko produzem mais IL-6 nesta fase da infecção (**Figura 9B**). Ao 19° e 26° dias após a infecção foi verificado que as células esplênicas tanto de animais 129 como 5-LOko reduziram a capacidade para produção de IL-1 e IL-6, porém, os animais 5-LOko mantiveram a capacidade para produção de IL-1 significativamente aumentadas quando comparados aos produzidos pelos animais 129 infectados (**Figura 9A e 9B**).

A determinação de TNF- α indica que esta citocina é produzida na fase inicial de infecção por *T. cruzi* (**Figura 9C**). Os dados apontam ainda que células esplênicas de animais 129 infectados produzem mais TNF- α no 5° dia após infecção, quando comparados aos níveis produzidos por animais 5-LOko infectados. Ademais, os dados indicam que no 12° dia após a infecção, os níveis de TNF- α em animais infectados se invertem, ou seja, células esplênicas de animais 5-LOko infectados produzem maiores níveis desta citocina, quando comparados aos níveis produzidos por células de animais 129 infectados (**Figura 9C**).

Os dados relativos à dosagem de IL-10 indicam que esta citocina já é produzida na fase inicial da infecção (5 dias) sem que haja diferenças significativas entre os grupos experimentais (**Figura 9D**). Verificamos que no 12° dia de infecção ocorre um aumento de produção desta citocina nos animais infectados, sendo que nessa fase os animais 5-LOko infectados produzem menos IL-10 que os animais 129. Esse perfil altera com o decorrer da infecção, quando no 19° e 26° dia de infecção foi verificado que comparativamente com os animais controles infectado, os animais 5-LOko produzem mais IL-10 (**Figura 9D**).

Em relação a IL-12, os dados indicam que esta citocina é produzida pelas células esplênicas de animais 129 infectados entre do 12° ao 19° de infecção (**Figura 9E**). Curiosamente, células esplênicas de animais 5-LOko infectados produzem, precocemente, maiores níveis de

IL-12 quando comparados aos níveis verificados em animais controles infectados. Os dados indicam ainda que os níveis desta citocina, em animais 5-LOko, aumentam gradativamente ao longo da fase aguda de infecção por *T. cruzi* (**Figura 9E**).

Por fim, os dados relativos à produção de IFN- γ indicam que, os animais 5-LOko infectados produzem maiores quantidades desta citocina após 5 e 12 dias de infecção quando comparados aos verificados para animais 129 infectados, sendo que o pico para produção de IFN- γ foi observado no 12º dia de infecção (**Figura 9F**). No 19º e 26º dias de infecção foi verificado que animais 5-LOko produzem menos IFN- γ , quando comparado aos produzidos por células provenientes de animais 129 (**Figura 9F**).

Figura 9. Níveis de citocinas em sobrenadantes de cultura de esplenócitos provenientes dos diferentes grupos experimentais ao longo da fase aguda de infecção. A – IL-1; B – IL-6; C – TNF- α ; D – IL-10; E – IL-12 e F – IFN- γ . Nos dias indicados, os esplenócitos dos diferentes grupos experimentais (n=7, por grupo experimental) foram isolados e cultivados por 24h (IL-1, IL-6 e IL-12) e por 48h (IL-10, TNF- α e IFN- γ). Os níveis de citocinas nos sobrenadantes foram quantificados pelo método de ELISA, conforme descrito no item 3.10. A figura representa os

dados de um experimento dentre dois realizados com resultados semelhantes. A linha tracejada representa o limite de detecção do método utilizado. *grupo infectado vs. o controle; #grupo 5-LOko infectado comparado ao grupo 129 infectado; $p < 0,05$.

4.5. Análise do fenótipo de células T do baço provenientes de camundongos 129 e 5-LOko infectados com *T. cruzi*.

Ao analisar um marcador celular de ativação recente (CD69) em amostras de células T esplênicas, verificou-se que a infecção de camundongos 129 com cepa Colombiana de *T. cruzi* leva a um discreto aumento de células T CD4⁺ expressando este marcador na fase inicial da infecção, como observado no 5º e 12º dias de infecção (**Figura 10A**). Este discreto aumento também foi verificado para células CD8⁺CD69⁺ até o 19º dia de infecção (**Figura 10B**). No entanto, na fase mais avançada da infecção, 19º dia para células T CD4⁺ e 26º dia de infecção para células T CD8⁺, foi verificado, neste grupo, um aumento significativo da população de células T expressando o marcador CD69 (**Figura 10B**). Os dados indicam que camundongos 5-LOko infectados, diferentemente do observado para camundongos 129 infectados, não apresentam um aumento da população de células T expressando marcador CD69 até o 12º dia de infecção (**Figura 10A e 10B**). De forma semelhante ao verificado em camundongos 129 infectados, camundongos 5-LOko infectados apresentam um aumento das populações de células CD4⁺ e CD8⁺, respectivamente no 19º e 26º dias, expressando o marcador CD69, porém, com menor amplitude (**Figura 10A e 10B**).

A análise de células T ativadas/memória expressando o marcador CD44⁺ mostrou que a infecção de camundongos 129 por *T. cruzi* leva a um aumento das células T expressando este fenótipo que pode ser observado já com 5 dias de infecção (**Figura 10C e 10D**). Este aumento pode ser verificado tanto em células expressando CD4⁺ ou CD8⁺ e é gradativo ao longo do curso da infecção. Por outro lado, camundongos 5-LOko infectados apresentam um aumento de células T CD44⁺ mais tardiamente, após 12 dias de infecção (**Figura 10C e 10D**). Ademais, os dados indicam que camundongos 5-LOko infectados mostram menores quantidades de células T CD4⁺CD44⁺ quando comparados aos números obtidos em camundongos 129 com 12, 19 e 26 dias de infecção (**Figura 10C**). Finalmente, não verificamos grandes diferenças numéricas na população de células T CD8⁺CD44⁺ entre camundongos 129 e 5-LOko infectados com 12, 19 e 26 dias de infecção (**Figura 10D**).

Os resultados indicam que a infecção de camundongos 129 pela cepa Colombiana de *T. cruzi* leva a um aumento do número de células T expressando o fenótipo CD4⁺CD25⁺, que se manteve elevado em todo o período de experimentação avaliado neste trabalho (**Figura 10E**). Camundongos 5-LOko, surpreendentemente, não apresentaram elevação no número de células T CD4⁺CD25⁺ durante a maioria do período de infecção, cujos números absolutos se assemelham aos verificados em animais controles, ou discretamente aumentados porém em menor número quando comparados aos verificados em camundongos 129 infectados no 26º dia de infecção (**Figura 10E**).

Figura 10. Fenótipo de células T esplênicas provenientes de animais infectados com *Trypanosoma cruzi*. Os dados da figura expressam os valores obtidos na análise de populações celulares do baço dos diferentes grupos experimentais com 5, 12, 19, 26 dias de infecção (n=5, por grupo experimental) obtidas por citometria de fluxo, conforme descrito no item 3.11. Os dados representam os resultados de um experimento dentre dois realizados com resultados similares.

Para verificar se as células T $CD4^+CD25^+$ são células T regulatórias (Treg), foram realizadas também uma terceira marcação para GITR (molécula da família do receptor do TNF induzidas por glicorticóides), um marcador específico para Treg. Nossos dados indicam que não há diferenças significativas desta população no baço de animais 129 e 5-LOko infectados com 26 dias após a infecção (**Figura 11**). No entanto, animais 129 controles apresentam aproximadamente 3 vezes mais células Treg no baço, quando comparados ao número destas células em animais 5-LOko controles.

Figura 11. Análise da população de células T regulatórias (Treg) no baço de animais infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. Os dados da figura expressam os valores obtidos na análise de populações celulares do baço dos diferentes grupos experimentais com 26 dias de infecção (n=5, por grupo experimental) obtidas por citometria de fluxo com tripla marcação, conforme descrito no item 3.11. Os dados representam os resultados de um experimento de dois realizados com resultados similares. $P < 0,001$

4.6. Análise do fenótipo de diferentes populações celulares do baço provenientes de camundongos 129 e 129 5-LOko infectados com *T. cruzi*.

A análise das células B através do marcador CD19 demonstra que esta população aumenta durante a infecção de camundongos 129 com a cepa Colombiana de *T. cruzi* (**Figura 12A**). Os dados indicam que há um grande aumento de células B em camundongos 129 durante a fase inicial de infecção que diminuem gradativamente no decorrer da infecção. Por outro lado, os

resultados demonstram que camundongos 5-LOko infectados apresentam um discreto aumento de células B na fase inicial da infecção que permanece em menor número após 5, 12 e 19 dias comparados aos camundongos 129 infectados (**Figura 12A**). Após 12 dias de infecção, curiosamente, o número de células CD19⁺ em camundongos 5-LOko aumenta gradativamente, sendo que no 26º dia, o número de células B nestes animais é maior que o verificado em camundongos 129 infectados (**Figura 12A**).

Camundongos 129 e 5-LOko infectados por *T. cruzi* possuem um aumento de células mononucleares expressando marcador F4/80 (**Figura 12B**). Os resultados indicam que camundongos 129 após 5 dias de infecção têm um aumento considerável de células F4/80⁺, que diminuem, porém continuam numericamente maiores que os valores de camundongos controles (12 e 19 dias), voltando a aumentar após 26 dias de infecção (**Figura 12B**). Por outro lado, camundongos 5-LOko infectados apresentam um aumento discreto de células F4/80⁺ na fase inicial da infecção (5º dia), que é menor ao verificado nesta fase em camundongos 129 infectados. Com o progresso da infecção, as células F4/80⁺ aumentam gradativamente, como observado no 12º e 19º dias pós-infecção, com valores numéricos maiores aos verificados neste período em camundongos 129 infectados (**Figura 12B**). Após 26 dias, animais 5LOko infectados e 129 infectados apresentam números extremamente aumentados de células expressando F4/80⁺, porém, sem diferenças significativas entre os grupos. Outro fato importante é que as análises de citometria de fluxo indicam que células F4/80⁺ seriam as células não linfóides majoritárias presentes no baço durante a infecção por *T. cruzi*, neste modelo.

Outra população de células analisada foi a que expressa Gr-1, um marcador de células polimorfonucleares, sub-populações de células dendríticas e uma população minoritária de células T. Os resultados indicam que a infecção de camundongos 129 por *T. cruzi* leva a um aumento discreto de células esplênicas expressando Gr-1 após 5 e 12 dias de infecção, que aumentam um pouco mais após 19 e 26 dias de infecção (**Figura 12C**). Ao contrário, camundongos 5-LOko infectados não apresentam aumento de células Gr-1⁺ na fase inicial da infecção, como verificado no 5º dia para camundongos 129 infectados. De forma importante, os resultados indicam que ocorre um grande aumento de células Gr-1⁺ no baço de camundongos 5-LOko no 12º dia de infecção (**Figura 12C**), que diminuem com o decorrer da infecção (19º e 26º dias) para números menores aos verificados em camundongos 129 infectados (**Figura 12C**).

Ao continuar a análise fenotípica de células esplênicas em camundongos infectados por *T. cruzi* verificou-se a presença de células dendríticas expressando o fenótipo Gr-1⁺ CD11c⁺. Os resultados expressos na **Figura 12D** indicam que camundongos 129 infectados apresentam uma elevação no número de células Gr-1⁺ CD11c⁺ na fase inicial da infecção (5º dia), porém, com o decorrer da infecção (12º e 19º dias) há uma diminuição das células com este fenótipo para níveis semelhantes aos observados em animais controles. Foi verificado que células Gr-1⁺ CD11c⁺ voltam a aumentar no baço de camundongos 129 no 26º dia de infecção (**Figura 12D**). De modo diferente, camundongos 5-LOko infectados não apresentam aumento de células Gr-1⁺ CD11c⁺ na fase inicial da infecção, mas aumentam bastante o número de células com este fenótipo no 12º e 19º dias de infecção, sendo que, o maior número destas células são encontrados no 12º dia de infecção (**Figura 12D**). No 26º dia, as células Gr-1⁺ CD11c⁺ em camundongos 5-LOko infectados diminuem, apresentando valores semelhantes aos verificados em camundongos controles.

Por fim, foram analisadas células esplênicas com o fenótipo CD11b⁺, um marcador de células da linhagem mielóide. Foi verificado que camundongos 129 infectados com 5 dias de infecção, apresentam um aumento de células CD11b⁺, que reduzem um pouco no 12º dia de infecção e voltam a aumentar gradativamente no decorrer da infecção, durante os 19º e 26º dias (**Figura 12E**). Por outro lado, camundongos 5-LOko infectados, na fase inicial de infecção, não apresentam aumento na população de células CD11b⁺ (**Figura 12E**). Estes animais apresentam um aumento de células esplênicas CD11b⁺ no 12º dia de infecção, que se mantêm ao longo da infecção (**Figura 12E**). No entanto, o aumento de células CD11b⁺ observado em camundongos 5-LOko infectados é numericamente a metade do verificado em camundongos 129 infectados.

Figura 12. Análise fenotípica de diferentes populações celulares esplênicas provenientes dos diferentes grupos experimentais. Os dados da figura expressam os valores obtidos na análise de populações celulares do baço dos diferentes grupos experimentais com 5, 12, 19 e 26 dias de infecção (n=5, por grupo experimental) obtidas por citometria de fluxo, conforme descrito no item 3.11. Os dados representam os resultados de um experimento dentre dois realizados com resultados similares.

4.7. Quantificação dos níveis séricos de NO₃ e NO₂ (produtos de oxidação do óxido nítrico – NO) em camundongos 129 e 129 5-LOko infectados por *T. cruzi*.

Os dados relativos às dosagens de NO₃ e NO₂ indicam que animais infectados por *T. cruzi* não produzem níveis significativamente alterados de NO na fase inicial da infecção (5º dia), quando os níveis de NO₃ e NO₂ foram semelhantes aos níveis basais medidos em soros de animais controles (**Figura 13**). Ao analisar os soros obtidos de animais com 12 ou mais dias de infecção, verificou-se que há um aumento significativo nos níveis séricos de NO₃ e NO₂, quando comparados aos animais controles. Verificamos que os níveis máximos em animais infectados seriam produzidos ao redor do 19º dia de infecção (**Figura 13**). Os dados indicam que no 19º dia após infecção, os soros de animais 129 infectados apresentaram maiores quantidades de NO₃ e NO₂, quando comparados aos níveis séricos de animais 5-LOko infectados (**Figura 13**). As diferenças nos níveis séricos de NO₃ e NO₂ entre camundongos 129 infectados e 5-LOko infectados não foram observadas em amostras de soro com 12 ou 26 dias de infecção.

Figura 13. Níveis séricos de NOx em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. Os dados indicam a média ± SEM da dosagem de NOx (NO₂/NO₃) em soros pelo método de Griess utilizando nitrato redutase após 5, 12, 19 e 26 dias de infecção (n=5, por grupo experimental), conforme descrito no item 3.6. A figura representa os dados de um experimento dentre dois realizados com resultados semelhantes. *grupo infectado comparado ao grupo controle; #grupo 5-LO-/- infectado comparado ao grupo 129 infectado; p<0,001.

4.8. Análise dos níveis séricos de anticorpos específicos para *T. cruzi* em camundongos 129 e 129 5-LOko infectados.

Para avaliar a se a produção de anticorpos específicos ao parasita estariam relacionados com a resistência a infecção ao *T. cruzi* verificados em camundongos 5-LOko, avaliamos os níveis séricos de anticorpos em animais com 19 e 26 dias após a infecção. Nossos dados indicam que durante a infecção ocorre produção de anticorpos específicos da classe IgG (**Figura 14A** e **Figura 14B**), que são predominantemente do isotipo IgG2a (**Figura 14E** e **Figura 14F**), mas não do isotipo IgG1 (**Figura 14B** e **Figura 14C**). Nossos dados indicam que camundongos 5-LOko infectados e camundongos 129 infectados apresentam níveis semelhantes de IgG específicos ao parasita 19 dias após a infecção (**Figura 14A**), no entanto, 26 dias após a infecção os camundongos 5-LOko surpreendentemente apresentaram menores níveis séricos de IgG específicos ao parasita quando comparados aos níveis séricos desta classe de anticorpos em camundongos 129 infectados (**Figura 14B**). A determinação dos isotipos indicou que os níveis séricos de IgG2a em camundongos 5-LOko são menores aos observados em camundongos 129 infectados, tanto após 19 quanto 26 dias de infecção (**Figura 14E** e **Figura 14F**)

Figura 14. Níveis séricos de anticorpos específicos para o parasita da classe IgG em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*. Os soros dos diferentes grupos experimentais foram obtidos 19 e 26 dias após a infecção. A análise dos anticorpos específicos foi determinado por ELISA indireto conforme descrito em material e métodos. Os dados da figura expressa média $\pm$ SD obtidos da análise individual dos soros (n=6, por grupo experimental) é representativo de um experimento de 2 realizados com resultados semelhantes. Nos gráficos C, D e F há significância entre as curvas ($p < 0,001$).

4.10. Avaliação da capacidade de Adesão/invasão (Aderidos e intracelulares) do *T. cruzi* e atividade tripanocida de macrófagos peritoneais de camundongos 129 e 129 5-LOko

As análises dos fenótipos celulares no baço demonstram que animais 5-LOko apresentam elevação numérica de células F4/80⁺ em grande parte da fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* (**Figura 12B**). Deste modo, decidimos investigar se estas células estariam envolvidas na resistência deste animal a infecção pelo parasita. Deste modo, macrófagos peritoneais de camundongos 129 e 129 5-LOko foram obtidos da cavidade peritoneal, estimulados *in vitro* com IFN- γ e LPS e cultivados na presença de *T. cruzi* (formas tripomastigotas) e divididos em dois grupos: 1- para avaliar a Adesão/invasão do parasita nos macrófagos; e 2- para avaliar a capacidade tripanocida, avaliada pela recuperação de formas tripomastigotas do parasita após a passagem do seu ciclo dentro do macrófago.

Os dados referentes aos experimentos de Adesão/invasão demonstram claramente que macrófagos de camundongos 129 após 4 horas de co-cultivo com o parasita, apresentam menor número de parasitas associados e internalizados, comparativamente ao número de parasitas associados e internalizados a macrófagos provenientes de camundongos 5-LOko (**Figura 15A**). Ainda, nossos dados indicam que o pré-tratamento dos macrófagos ativados com L-NAME (um inibidor de NOS) antes do co-cultivo com os parasitas parece afetar diferentemente a interação e internalização do *Trypanosoma*, facilitando a adesão e entrada do parasita nos macrófagos de animais 129 e inibindo a associação e internalização do parasita em macrófagos provenientes de animais 5-LOko (**Figura 15A**).

Por fim, os resultados referentes à recuperação de parasitas, demonstram claramente que macrófagos ativados de animais 5-LOko são extremamente eficientes na destruição do *T. cruzi*, visto que o número de formas tripomastigotas liberados por estas células ao longo de 5 dias de infecção é bem menor que o número obtido de macrófagos provenientes de animais 129 (**Figura 15B**). De forma importante, nossos dados de recuperação de parasitas em macrófagos ativados de animais 129 tratados com L-NAME, sugere que essa droga afeta negativamente a destruição intracelular do parasita, como observado para células provenientes de animais 129, mas, não seria relevante para a destruição intracelular do parasita por macrófagos ativados provenientes de animais 5-LOko (**Figura 15B**).

Figura 15. Avaliação da adesão/invasão do parasita e da atividade tripanocida de células peritoneais aderentes. A – tripomastigotas associados e internalizados a macrófagos; B – nº de parasitas recuperados ao longo 5 dias de infecção. (n=4, por grupo experimental). Os dados do gráfico é representativo de um experimento de 2 realizados com resultados semelhantes. Os dados indicam a média $\pm$ SEM da contagem do número de parasitas realizada em 200 macrófagos (A) ou em câmara de Neubauer (B).*# $p < 0,005$

Discussão

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra que mediadores lipídicos como a PGE₂, LTB₄ e LTC₄ são produzidos durante a fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi* (cepa Colombiana) em camundongos 129 (**Figura 1**). Pela primeira vez, nossos dados mostram que camundongos 129 deficientes da enzima 5-lipoxigenase (5-LOko) infectados, quando comparados aos camundongos 129 infectados, apresentam: (1) uma menor parasitemia durante a fase aguda da doença (**Figura 2**); (2) menor índice de mortalidade (**Figura 3**); e (3) um menor infiltrado inflamatório, com menor número de ninhos de amastigotas no tecido muscular cardíaco (**Figura 4 e Tabela 1**) e esquelético (**Figura 5 e Tabela 1**). Portanto, indicam que animais deficientes de 5-LO são capazes de elaborar uma resposta imune mais eficiente frente o parasita, sugerindo que, na infecção pelo *T. Cruzi*, leucotrienos e outros metabólitos gerados pela enzima 5-Lipoxigenase, contribuiriam diminuindo a resistência do hospedeiro frente ao parasito.

Durante a infecção pelo *T. cruzi*, tem sido demonstrado que há envolvimento de diversos mediadores lipídicos como LTB₄ (WIRTH & KIERZENBAUM, 1985a; TALVANI et al., 2002); LTC₄ (WIRTH & KIERZENBAUM, 1985b); Prostaglandinas (TARLETON, 1988; NOMIZO et al., 1995; CELENTANO et al., 1995; PINGE-FILHO et al., 1999; MELO et al., 2003; MICHELIN et al., 2005); PAF (TALVANI et al., 2003) PGF_{2α}, 6-keto PGF_{1α}, TXB₂ (CARDONI & ANTUNEZ, 2004). Embora a dosagem sérica ou em sobrenadantes de cultura de mediadores lipídicos como a PGE₂ (MELO et al., 2003) e PGF_{2α}, 6-keto PGF_{1α}, TXB₂ (CARDONI & ANTUNEZ, 2004). tenham sido mostrados anteriormente durante a infecção pelo *T. cruzi*, nosso trabalho é pioneiro demonstrando a produção de LTB₄ e LTC₄ (**Figura 1A e Figura 1C**), respectivamente. Adicionalmente nossos resultados mostram que animais infectados deficientes de Leucotrienos não aumentam a produção de PGE₂, como verificados em outros modelos utilizando animais 5-LOko (GOULET et al., 1994; PETERS-GOLDEN et al., 2002; OKUNISHI et al., 2004), pelo contrario, em grande parte do período de infecção analisado nesse trabalho, os níveis de PGE₂ em camundongos 5-LOko são semelhantes ou menores aos produzidos por camundongos controles infectados (**Figura 1B**).

5.1. Citocinas e Mediadores lipídicos na infecção

Para tentar entender o que tornam os camundongos 5-LOko mais resistentes a infecção pelo *T. cruzi*, realizamos a análise da produção de citocinas por células esplênicas. Assim,

verificamos a produção de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IL-12 e IFN- γ por células esplênicas de animais controles e animais infectados (**Figura 7**). Os resultados indicam que células esplênicas provenientes de camundongos 5-LOko infectados na fase inicial de infecção produzem mais IL-1 β (5° dia) ou em níveis semelhantes (12° dia) (**Figura 7A**) e IL-6 (5° e 12° dias) (**Figura 7B**), quando comparados aos níveis detectados em amostras provenientes de animais controles infectados. Esses dados nos permitem especular que estas citocinas, produzidas precocemente ou em maiores quantidades ou mesmo sendo produzidas em fases subseqüentes, como verificado para IL-1 β (19° e 26° dias) (**Figura 7A**) e IL-6 (19° dia) por camundongos 5-LOko, poderiam estar envolvidos com os reduzidos números de parasitas circulantes no primeiro pico de parasitemia e ausência do segundo pico (**Figura 1**), bem como, o menor parasitismo nos músculos e eliminação mais rápida nestes animais (**Tabela 1**).

Esta possibilidade é sustentada, por trabalhos anteriores demonstrando que a produção de IL-6 está relacionada com o controle mais eficiente de parasitas circulantes (GAO & PEREIRA, 2002; OHSHIMA et al., 1998) e a geração de uma resposta imune efetiva contra *T. cruzi* (TARLETON et al., 2000), bem como que, a IL-1 β produzida durante a infecção pelo parasito (ZANG & TARLETON, 1996) é importante para eliminação do parasito circulante (REED et al., 1989), bem como, parasitas presentes no citoplasma de células musculares (MACHADO et al., 2000; FISHERA et al., 2004).

Em vários modelos experimentais tem sido descrito que Leucotrienos potencializam a produção de IL-1 β (DINARELLO et al., 1984; ROLA-PLESZCZYNSKI & LEMAIRE, 1985; KAGEYAMA et al., 1994; KIM et al., 2006) e IL-6 (POUBELLE et al., 1991; ROLA-PLESZCZYNSKI & STAHKOVA, 1992; HARIZI et al., 2003), no entanto, em nosso modelo onde há deficiência de produção de Leucotrienos estas citocinas estão aumentadas ou em níveis semelhantes aos verificados em camundongos controles. Uma possível explicação para esse aparente paradoxo seria a redundância funcional dos diferentes mediadores que participam da inflamação/resposta imune, deste modo, a produção de IL-1 poderia estar sendo estimulada por vias independentes de Leucotrienos (PARKAR et al., 1990), como por exemplo, através de moléculas padrão associados aos patógenos (PAMPs) que se associam ao receptor Toll-Like-4 (TLR-4) (BAUMGARTEN et al., 2001), como os glicoinositolfosfolipídeos do *T. cruzi* (OLIVEIRA et al., 2004). Nesse sentido a produção de IL-6 estaria sendo estimulada na ausência de Leucotrienos pela própria IL-1 presente neste nicho (SIRONI et al., 1989; HARIGAI et al.,

1989) ou mesmo pela PGE₂, um indutor de produção de IL-6 (MARCINKIEWICZ & CHAIN, 1993).

Os dados relativos ao TNF- α indicam que esta citocina é produzida na fase inicial da infecção (5º dia) (**Figura 7C**) e diferentemente do verificado para IL-1 β e IL-6, animais 5-LOko produzem menores quantidades de TNF- α , quando comparados aos produzidos por animais controles (**Figura 7C**). Embora em níveis inferiores aos verificados no 5º dia de infecção e diferentemente dos animais controles infectados, os animais 5-LOko mantêm a capacidade para produção desta citocina no 12º dia de infecção. Tem sido demonstrado que o TNF- α é produzido durante a infecção pelo *T. cruzi* (TARLENTON, 1988) e contribui para a atividade tripanocida (DE TITTO et al., 1986; PLAYFAIR & TAVERNE, 1987) e resistência à infecção (PLAYFAIR & TAVERNE, 1987; SILVA et al., 1995).

Por outro lado a produção excessiva de TNF- α durante a infecção parece contribuir para uma maior susceptibilidade ao parasito (RUSSO et al. 1988; STAROBINAS et al. 1991; LIMA et al., 2001), levando a exacerbação da imunopatologia nos tecidos infectados (CASTANOS-VELEZ et al., 1998; ALIBERTI et al., 2001), imunossupressão de linfócitos T (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1995), apoptose de células esplênicas (MARTINS et al., 1998), indução de caquexia (TRUYENS et al., 1995) ou mesmo choque e morte dos animais infectados (STAROBINAS et al., 1991; HÖLSCHER et al., 2000). Neste sentido, é possível que manutenção na produção de TNF- α em camundongos 5-LO infectados no 12º de infecção (**Figura 7C**) poderiam estar relacionados a uma mortalidade precoce de parte destes animais (**Figura 3**). Embora em nosso método de detecção de TNF- α não tenhamos observado a produção desta citocina por células esplênicas é importante ressaltar que essa citocina diferentemente das outras podem ser produzidas por células não hematopoiéticas, que poderiam produzir TNF- α e infelizmente não ser detectado ou mesmo o TNF- α funcional exposto na membrana das células (LIU et al., 1992).

Os níveis elevados de TNF- α em animais 129 no 5º dia de infecção (**Figura 7C**) sugerem ainda que LTB₄ produzido nestes animais (**Figura 1A**) poderia estar envolvido na regulação positiva de produção de TNF- α durante a fase inicial da infecção. Esta hipótese é reforçada, pois, o LTB₄ parece modular positivamente a produção de TNF- α (TALVANI et al., 2002). O TNF- α em camundongos 5-LO com 12 dias de infecção (**Figura 7C**) por outro lado estaria sendo estimulado pelo IFN- γ , um potente indutor de TNF- α (DINARELLO et al., 1986; Arenzana-

Seisdedos et al., 1987; Hart et al., 1988), presentes em abundancia nessa fase da infecção (**Figura 7F**).

Foi avaliada ainda a produção de IL-10. Nossos demonstram que essa citocina é produzida em maiores quantidades na primeira quinzena de infecção (5° e 12° dias) (**Figura 7D**). Verificamos que não há diferenças para produção de IL-10 no 5° dia de infecção entre os camundongos controles e camundongos 5-LOko, no entanto, após 12 dias de infecção, podemos observar que células esplênicas de animais 5LOko produzem menos IL-10 (**Figura 7D**). A IL-10 é produzida durante a infecção pelo *T. cruzi* e exerce uma atividade imunoregulatória levando a susceptibilidade ao parasita (REED et al., 1994), inibindo a atividade tripanocida dos macrófagos estimulados pelo IFN- γ (SILVA et al., 1992), nesse sentido, foi verificado que animais deficientes de IL-10 (IL-10ko) apresentam menor parasitemia e parasitismo tissular e apresentam aumento na capacidade para produção de IL-12, TNF- α e IFN- γ (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996; HUNTER et al., 1997). Assim, a menor produção de IL-10 em animais 5-LOko no 12° dia de infecção poderia levar a uma maior produção de TNF- α (**Figura 7C**), IL-12 (**Figura 7E**) e IFN- γ (**Figura 7F**) nesta fase da infecção e justificaria a menor parasitemia nestes animais (**Figura 2**). O melhor controle de agentes infecciosos em animais 5-LOko e reduzida capacidade para produção de IL-10 também foi observado na infecção pelo *Schistosoma mansoni* (SECOR et al., 1998).

Mais ainda a manutenção para capacidade produção de IL-10 no 19° e 26° dias em camundongos 5-LOko, mas, não em camundongos controles (**Figura 7D**), poderia ser explicado por um possível envolvimento da PGE₂, pois, camundongos 5-LOko, diferentemente dos camundongos controles, mantém a capacidade para produção deste mediador lipídico (**Figura 1B**). Essa hipótese é sustentada porque em outros modelos tem sido verificado que a PGE₂ estimula a produção de IL-10 por macrófagos (STRASSMANN et al., 1990; OH-ISHI et al., 1996) e células dendríticas (KAMBAYASHI et al., 2001; HARIZI et al., 2002).

Um outro fato relacionado a IL-10 em nosso modelo seria relativo à mortalidade dos animais infectados. Nossos dados relativos a IL-10 indicam claramente que animais controles, diferentemente dos animais 5-LOko, não produzem IL-10 (19° dia de infecção) (**Figura 7D**), período que coincide com o início da mortalidade deste grupo de animais (**Figura 4**). Essa correlação parece ser verdadeira, pois, animais IL-10ko infectados apesar de apresentarem menor

parasitemia, morrem mais precocemente que os animais controles (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996; HUNTER et al., 1997).

A IL-12 foi descrita como uma citocina estimuladora de células NK (KOBAYASHI et al., 1989), indutora de produção de IFN- γ por células NK e linfócitos T (CHAN et al., 1991) e seria a principal citocina promotora de resistência a patógenos pela resposta imune inata, independente de células T (GAZZINELLI et al., 1994; TRIPP et al., 1994), bem como, é fundamental para polarização da resposta imune adaptativa mediada por linfócitos (SYPEK et al., 1993).

De forma importante, verificamos que animais infectados produzem IL-12 (**Figura 7E**). Os nossos resultados indicam que animais 5-LOko infectados apresentam produção aumentada de IL-12 em todos os dias de infecção analisados (**Figura 7E**), sugerindo que a proteção destes animais na fase aguda da infecção, poderia estar associada a maior produção desta citocina. A IL-12 pode ser induzida pelo *T. cruzi* (FROSCH et al., 1996) e animais IL-12ko são mais susceptíveis a infecção pelo *T. cruzi* (GALVÃO DA SILVA et al., 2003; BASTOS et al., 2002). A IL-12 é uma citocina fundamental para a destruição de parasitas circulantes estimulando a produção de TNF- α e IFN- γ (HUNTER et al., 1996), que ativam macrófagos e outras células fagocíticas para indução de morte intracelular do parasita via indução de óxido nítrico (NO) (VESPA et al., 1994; SILVA et al., 1995; ALIBERTI et al., 1996). A IL-12 também é relevante para destruição de parasitas nos tecidos (MICHAILOWSKY et al., 2001) via indução de quimiocinas e NO em cardiomiócitos (MACHADO et al., 2000).

O nosso modelo demonstra que a deficiência Leucotrienos levaria a um aumento de produção de IL-12. Esse fenômeno parece ser verdade, pois, o bloqueio da ação de Leucotrienos in vitro (JOZEFOWSKI et al., 2005) ou in vivo (MACHIDA et al., 2004) por antagonistas de receptor para Leucotrienos BLT1, como o U-75302, leva a um aumento de produção de IL-12 por células dendríticas. O aumento de produção de IL-12 em camundongos 5-LOko tem sido correlacionado com resistência à infecção pelo *Schistosoma mansoni* (SECOR et al., 1998) e o aumento de produção de IL-12 concomitante com a redução de produção de Lipoxina A₄ (LXA₄) em camundongos 5-LOko, com maior capacidade de destruição do patógeno na infecção pelo *Toxoplasma gondii* (ALIBERTI et al., 2002B) e *Mycobacterium tuberculosis* (BAFICA et al., 2005). Em outros modelos, embora esteja relacionado à susceptibilidade, o da Strongiloidíase em camundongos 5-LOko também foi verificado que ocorre um aumento de produção de IL-12 (MACHADO et al., 2005) e ainda animais deficientes de 12/15 Lipoxigenase (12/15LOko)

apresentam deficiência para produção de IL-12 (ZAO et al., 2002). Por outro lado, no modelo de infecção pelo *Histoplasma capsulatum*, o tratamento com um inibidor da FLAP, proteína ativadora de 5-lipoxigenase (MK-886), foi verificado que ocorre a inibição de produção de IL-12 (MEDEIROS et al., 2004).

Embora neste trabalho não tenhamos demonstrado quem seriam as células produtoras de IL-12, as análises do fenótipo celular indicam que seriam as células Gr-1⁺ (BLISS et al., 2000), Gr-1⁺CD11c⁺ (GRAGE-GRIEBENOW et al., 2001; DALOD et al., 2002), F4/80⁺ (FISHER et al., 2000; MORDUE & SIBLEY, 2003) na primeira quinzena de infecção e F4/80⁺ (FISHER et al., 2000; MORDUE & SIBLEY, 2003), e IL-12 dependente de células T (UNE et al., 2003 e dados não mostrados).

O IFN- γ faz parte de uma família de citocinas que foi originalmente descrito com um potente inibidor replicação viral (ISSAC & LINDENMANN, 1957) e potente ativador de macrófagos (SCHULTZ et al., 1977). Os dados relativos ao IFN- γ indicam que células de animais infectados produzem IFN- γ (**Figura 7F**) e demonstram que animais 5-LOko infectados comparativamente aos animais controles infectados, produzem maiores quantidades desta citocina após 5° e 12° dias de infecção, que é justamente quando começa a aparecer formas circulantes do parasita, e estão em menor número. Esses dados indicam que esta citocina poderia estar envolvido na melhor eficiência de animais 5-LOko na capacidade de controlar o número de parasitas e conseqüente resistência ao parasita.

De fato trabalhos anteriores corroboram com essa possibilidade, pois, o tratamento de animais infectados com IFN- γ previne o aparecimento da fase aguda e reduz a mortalidade dos animais (REED, 1988) e a neutralização de IFN- γ in vivo pelo tratamento com anticorpos monoclonais anti-IFN- γ tornam animais resistentes susceptíveis levando-os a morte (SILVA et al; 1992), nesse sentido, foi demonstrado que animais deficientes de receptores para IFN- γ (IFN- γ Rko) (HÖLSCHER et al., 1998) ou animais deficientes de IFN- γ (IFN- γ ko) (MARTINS et al., 1999) são altamente susceptíveis a infecção pelo *T. cruzi* elevando de forma drástica o número de parasitas no sangue e tecidos e induzindo a mortalidade em 100% dos animais (HÖLSCHER et al., 1998; MARTINS et al., 1999). Em outros modelos de infecção/Inflamação também tem verificado que a resistência de animais 5-LOko está relacionado ao aumento da produção de IFN- γ como na Schistosomíase (SECOR et al., 1998), Toxoplasmose (ALIBERTI et al., 2002), Tuberculose (BAFICA et al., 2005) e Fibrose pulmonar (PETERS-GOLDEN et al., 2002).

Tem sido demonstrado que Leucotrienos modulam positivamente a produção de IFN- γ em vários modelos como pela estimulação direta de leucócitos do sangue humano (JOHNSON & TORRES, 1984; ROLA-PLESZCZYNSKI et al., 1987) ou esplenócitos de camundongos na presença LTB₄ (ARCOLEO et al., 1995); estimulação de esplenócitos de camundongos com LTC₄ (KATO et al., 1990); bloqueio da produção de IFN- γ por células mononucleares humanas (ANTONELLI et al., 1990) ou esplenócitos de camundongos (KATO et al., 1990) cultivadas com inibidor de lipoxigenase, Acido Nordihidroguaiaretico-NDGA ou células T esplênicas estimuladas com anti-CD3 e cultivadas na presença de antagonista do receptor de Cis-Leucotrienos, Montelukast-MNT (SPINOZZI et al., 2004) e infecção pelo *Histoplasma capsulatum* em camundongos tratados com MK-886 (MEDEIROS et al., 2004).

No entanto, em nosso modelo de infecção com deficiência de produção de LTB₄ (**Figura 1A**) e LTC₄ (**Figura 1C**), verificamos que há um aumento significativo dos níveis de IFN- γ nos 5° e 12° dias de infecção (**Figura 7F**). Estes dados indicam que a ausência de Leucotrienos estaria favorecendo a produção de IFN- γ . De fato tem sido mostrado no modelo de Schistosomíase (SECOR et al., 1998), Toxoplasmose (ALIBERTI et al., 2002), Tuberculose (BAFICA et al., 2005), Strongiloidíase (MACHADO et al., 2005) em camundongos 5-LOko também ocorre um aumento de IFN- γ , bem como que, linfócitos T humanos normais estimulados com anti-CD3 e cultivadas na presença de antagonista do receptor de Cis-Leucotrienos, Montelukast-MNT aumentam a capacidade dessas células para produção de IFN- γ (NAKATA et al., 2005).

Outra possibilidade seria que citocinas presentes nesses animais poderiam estar estimulando a produção a produção de IFN- γ em animais 5-LOko. Um candidato possível seria a IL-12 que estão aumentados nessa fase da infecção (**Figura 7E**) e tem sido descrito como um potente indutor de IFN- γ (CHAN et al., 1991). De fato, durante que a infecção pelo *T. cruzi* a IL-12 é produzida (ALIBERTI et al., 1996), bem como a IL-18, outro indutor de IFN- γ (MULLER et al., 2001).

Ainda, verificamos que os níveis de IFN- γ em camundongos 5-LOko infectados estão diminuídos no 19° e 26° dias de infecção (**Figura 7F**). Uma possível explicação para este fato seria pela presença concomitante de IL-10 (**Figura 7D**). De fato tem sido mostrado que a IL-10 inibe a produção (TAGA & TOSATO, 1992) e/ou atividade funcional do IFN- γ (FIORENTINO

et al., 1991). A IL-10 modulando a ação do IFN- γ também ocorreria no modelo de infecção pelo *T. cruzi* (SILVA et al., 1992; GAZZINELLI et al., 1992; MINOPRIO et al., 1993).

No modelo de *T. cruzi* e outros parasitas intracelulares o IFN- γ é considerado o principal mediador para destruição do parasita e foi a primeira citocina utilizada *in vitro* para ativação de macrófagos para destruição do parasita localizados intracelularmente (WIRTH et al., 1985). Trabalhos anteriores, que a posteriori foram demonstrados como sendo o IFN- γ responsável pela ativação de macrófagos para atividade tripanocida (ROFF, 1976; NOGUEIRA & COHN, 1978), verificaram que a H_2O_2 liberada pelos macrófagos seriam relevantes para a destruição do parasita (NATHAN et al., 1979) e somente em 1987, Reed e colaboradores demonstraram que o IFN- γ ativa macrófagos matando parasitas via $H_2O_2/O_2^{\bullet}$. Trabalhos subsequentes demonstraram que o IFN- γ também seria importante para estimular o macrófago para atividade tripanocida, via óxido nítrico (VINCENDEAU & DAULOUEDE, 1991; MUNOZ-FERNANDEZ et al., 1992). O IFN- γ também seria importante para matar o *Trypanosoma* presente no meio extracelular via espécies reativas derivadas do oxigênio (ROS) e espécies reativas derivadas do nitrogênio (RNS) secretado por macrófagos (Gobert et al., 1998). De fato, o mecanismo mais próximo do que estaria ocorrendo *in vivo* seria o IFN- γ induzindo a morte de parasitas pela secreção concomitante de ROS e RNS, pois, o peroxinitrito, uma espécie reativa é gerada pela reação do $O_2^{\bullet}$ e NO demonstrou ter uma potente atividade tripanocida (DENICOLA et al., 1993). No entanto, tem sido descrito que o IFN- γ seria capaz de induzir a morte de parasitas intracelulares por via independente de ROS e RNS (HALONEN & WEISS, 2000).

Diversos trabalhos descrevem a participação do óxido nítrico (NO) tanto na resistência, como na susceptibilidade à infecção por parasitas, fungos e bactérias (revisto em RILEY et al., 2006; KJAERGAARD & RASMUSSEN, 1996). Os resultados deste trabalho indicam animais infectados produzem NO, medida pelos seus metabólitos NO_2 e NO_3 (**Figura 11**), confirmando observações anteriores (PETRAY et al., 1994). A produção de NO possivelmente estaria sendo estimulada pela IL-12 (**Figura 7E**; ALIBERTI et al., 1996) e IFN- γ (**Figura 7F**; VINCENDEAU & DAULOUEDE, 1991; MUNOZ-FERNANDEZ et al., 1992), ainda em outros modelos, tem sido descrito que o NO durante infecções sistêmicas ou sepse endotóxico, não seriam produzidas majoritariamente por células hematopoiéticas e sim por células do parênquima do fígado, pulmões e trato digestivo (BULTINCK et al., 2006).

Os mediadores lipídicos também parecem modular a produção de NO. Tem sido descrito que LTC₄ induz a produção de NO em células endoteliais (MAYHAN, 1993) e neutrófilos (LÄRFANS et al., 1999). O LTD₄ também induz produção de NO em neutrófilos (LÄRFANS et al., 1999). O LTB₄ induz produção de NO em neutrófilos (SCHMIDT et al., 1989; MCCALL et al., 1989), potencializa o efeito do PAF e IFN- γ para produção de NO em macrófagos (TALVANI et al., 2002) via BLT1 (SEREZANI et al., 2006). Interessantemente a indução de NO pela IL-1 β em miócitos do ventrículo cardíaco é inibido pelo tratamento com inibidor de lipoxigenase, Acido Nordihidroguaiaretico-NDGA (LAPOINTE & STIKINS, 1998). A PGE₂ também regula a produção de NO. Assim, tem sido descrito que a PGE₂ potencializa o efeito do IFN- γ e TNF- α na estimulação de mRNA para iNOS em macrófagos (MAUEL et al., 1995; PINGE-FILHO et al., 1999) e potencializa o efeito da IL-1 β para produção de NO em miócitos de ventrículo cardíaco (LAPOINTE & STIKINS, 1998).

Nossos dados demonstram que camundongos 5-LOko infectados apresentam níveis séricos de NO semelhantes (12° e 26° dia de infecção) ou mesmo significativamente inferiores (19° dia de infecção), aos verificados em camundongos 129 infectados (**Figura 11**). A produção de níveis semelhantes por animais infectados controles e 5-LOko no 12° dia de infecção são intrigantes, pois, os animais controles apresentam como indutores de NO: baixos níveis relativos de IL-12 e IFN- γ e altos níveis relativos de PGE₂ e LTB₄; apresentam como inibidores da produção de NO: altos níveis relativos de IL-10. Este perfil de mediadores correlaciona com um elevado número de parasitas circulantes e nos músculos, e presença de maior infiltrado inflamatório. Por outro lado, animais infectados 5-LOko apresentando níveis semelhantes de NO observados em animais controles apresentam como indutores de NO, altos níveis relativos de IL-12 e IFN- γ e baixos níveis relativos de TNF- α e PGE₂ e apresentam como inibidores da produção de NO, menores níveis relativos de IL-10. Este quadro correlaciona com um menor número de parasitas circulantes e nos músculos e presença de menor infiltrado inflamatório.

Embora tenhamos consciência que estes mediadores não refletem o universo do que estaria de fato ocorrendo *in vivo*, poderíamos especular que possivelmente haveria uma preponderância funcional de determinado (os) mediador (es), por exemplo, o fato de animais controles infectados terem como os mais abundantes indutores de NO a PGE₂ e LTB₄ e quantitativamente menores níveis de IL-12 e IFN- γ possivelmente favoreceria a predominância da atividade modulatória dos altos níveis de IL-10. Este fato poderia ser justificado, pois, a IL-10

modula a produção de IL-12 e IFN- γ (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996; HUNTER et al., 1997), modula atividade microbicida de macrófagos estimulados com IFN- γ (SILVA et al., 1992; GAZZINELLI et al., 1992; MINOPRIO et al., 1993), mesmo na presença de LTB₄ (TALVANI et al., 2002) o que justificaria o grande número de parasitas circulantes, mais ainda os altos níveis de PGE₂ poderia ser as responsáveis pelos maiores níveis de IL-10 (STRASSMANN et al., 1990; OH-ISHI et al., 1996) e finalmente o maior infiltrado inflamatório seria decorrente da presença dos altos níveis de LTB₄ que induziriam a migração de macrófagos (FORD-HUTCHINSON et al., 1980; MIGLIORISI et al., 1987; SERHAN & PRESCOTT, 2000), células T (JORDAN et al., 1986; TERNOWITZ et al., 1986; BACON et al., 1988; ROSS et al., 1990; LEPPERT et al., 1995; TAGER et al., 2003) e células TCD8⁺ (GOODARZI et al., 2003; OTT et al., 2003; MEDOFF et al., 2005; MIYAHARA et al., 2005) e o maior infiltrado inflamatório de células mononucleares também poderia ser devido à ação do LTC₄ (HONIG et al., 2003). A inabilidade de animais 129 infectados destruírem parasitas nos tecidos, também, poderia ser atribuída ao LTB₄ que inibiria a atividade funcional da IL-1 β detectada nestes animais de induzir a produção de NO pelos miócitos (LAPOINTE & STIKINS, 1998).

Já em animais 5-LOko infectados que apresentam como indutores de NO: altos níveis relativos de IL-12 e IFN- γ e baixos níveis relativos de TNF- α e PGE₂ não permitiria a atividade regulatória da IL-10 que se apresentam diminuídos. Deste modo, mecanismos importantes para o controle do parasita seriam preservados como a IL-12 que estimularia a produção de TNF- α e IFN- γ (HUNTER et al., 1996) e induziria uma atividade tripanocida eficiente em macrófagos para destruição intracelular via ROS (NATHAN et al., 1979; REED et al., 1987) e RNS (VINCENDEAU & DAULOUEDE, 1991; MUNOZ-FERNANDEZ et al., 1992). A IL-12 ainda poderia ativar células NK para destruição de parasitas circulantes (LIEKE et al., 2004). O IFN- γ por sua vez poderia também contribuir para a destruição de parasitas circulantes por mecanismos dependentes de ROS e RNS (GOBERT et al., 1998) ou intracelularmente por mecanismos independentes de ROS e RNS (HALONEN & WEISS, 2000) e desta forma levaria a redução de parasitas circulantes que são observados em camundongos 5-LOko nessa fase da infecção. A ausência de Leucotrienos inibiria a migração de células e conseqüente redução no infiltrado celular inflamatório nos músculos, bem como, permitiriam que a IL-1 β (MACHADO et al., 2000; FISHERA et al., 2004) elevada nessa fase da infecção em sinergismo com a PGE₂ (LAPOINTE & STIKINS, 1998) presentes nessa fase da infecção, juntamente como a IL-12 (MACHADO et

al., 2000; MICHAILEWSKY et al., 2001) estimulariam a produção de NO em miócitos para destruição de parasitas localizados em seu citoplasma.

No 19º dia de infecção, que temporalmente correlaciona com o segundo pico de parasitemia (**Figura 2**), bem como, uma mortalidade maior em camundongos controles (**Figura 3**), verificamos que correlaciona com a presença de elevados níveis de NO sérico nestes animais. Ao contrário, camundongos 5-LOko infectados apresentam número muito reduzido de parasitas circulantes (**Figura 2**), apresentam uma redução significativa nos níveis de NO séricos, associados ao maior percentual de sobrevivência dos animais 5-LOko (**Figura 2**).

Os níveis elevados de NO em animais controles infectados poderiam ser decorrentes da ausência de níveis detectáveis de IL-10 (ROGGERO et al., 2002) e presença de indutores do NO como a IL-12 e IFN- γ e principalmente pelos elevados níveis de LTB₄ e LTC₄. A produção excessiva de NO poderia levar a um quadro de susceptibilidade verificada nestes animais, de fato, elevadas quantidades de NO tem sido relacionado com a susceptibilidade à infecção pelo parasito (MARTINS, 1998; MARTINS et al., 1999; CARDILLO et al., 2004; BASSO et al., 2004, QUAISSI & QUAISSI, 2005; WALLACE, 2005) e no modelo de infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* (NASCIMENTO et al., 2002; PINA et al., 2006). A excessiva produção de NO modularia a atividade funcional de linfócitos T (ABRAHAMSON & COFFMAN, 1995), seguida de indução apoptose de células esplênicas (MARTINS et al., 1998) e macrófagos ao fagocitar células apoptóticas produziram TGF- β (FADOK et al., 1998), uma potente citocina imunossupressora e desativadora de macrófagos (BOUTARD et al., 1995) que poderia também ser induzida pela LTC₄ (PERNG et al., 2006), e desativar ela própria e outros macrófagos propiciando um ambiente favorável para multiplicação do *T. cruzi* (FREIRE DE LIMA et al., 2000).

O LTB₄ presentes nestes animais poderia levar a estimulação de receptores estimulados por proliferadores de peroxissomos α (PPAR- α) (DEVCHAND et al., 1996) induzindo a produção de Heme Oxidase 1 (HO-1), um potente indutor de monóxido de carbono (CO) e inibiria a ativação do Fator de Transcrição Nuclear κ B (NF- κ B) (WAYMAN et al., 2002), assim o NO, CO, TGF- β e bloqueio do NF- κ B levaria a uma imunossupressão severa em células fagocíticas e linfócitos.

Mais ainda, o LTC₄ induziria NO em células da microvasculatura, aumentando a permeabilidade vascular e levando o extravasamento de plasma para o tecido, causando um

quadro de choque (MAYHAN, 1993; BENJAMIM et al., 2005), levando a morte dos animais. De fato, tem sido descrito que animais infectados pelo *T. cruzi* são extremamente susceptíveis a indução de choque induzido pela enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB), levando a morte de 100% dos animais (PAIVA et al., 2003). Ainda, tem sido descrito que a presença de TNF- α , IL-12 e IFN- γ na produção diminuída ou ausência de IL-10 também levariam a um quadro de choque em animais infectados pelo *T. cruzi* (HÖLSCHER et al., 2000). Embora em nosso modelo não tenhamos detectado TNF- α , um mediador envolvido no choque séptico e susceptibilidade a infecção ao *T. cruzi* (HÖLSCHER et al., 2000) e o LTB₄ presente nesses animais poderiam potencializar a ação desta citocina (VAN PUIJENBROEK et al., 1999).

Diferentemente, camundongos 5-LOko sobreviveriam porque não produz Leucotrienos, os principais mediadores envolvidos na produção de NO e indução de choque e a presença de IL-10 possivelmente estaria modulando a produção de NO mediado pela PGE₂ presente nessa fase da infecção, mas, não pela IL-12, pois, essa citocina somente induz a produção de NO dependente de IFN- γ , que estão diminuídos e TNF- α , que estão ausentes (HUNTER et al., 1996). Assim, em nosso modelo a resistência e ausência de mortalidade de animais 5-LOko nesta fase da infecção estaria relacionado possivelmente à presença de IL-12 (ALIBERTI et al., 1996), IL-1 β (ZHANG & TARLENTON, 1996), IFN- γ (SILVA et al., 1992), fatores sabidamente ativadores de macrófagos, mais ainda, a IL-1 β associado a IL-12 poderiam estar ativando células NK (HUNTER et al., 1995) para atividade tripanocida (LIEKE et al., 2004) permitindo a esse animal controlar eficientemente a infecção pelo *T. cruzi*.

5.2. Perfil de células esplênicas durante a fase aguda de infecção pelo *T. cruzi*

Os resultados referentes à análise fenotípica de células T em camundongos 129 e 5-LOko infectados com *T. cruzi* demonstram que camundongos 5-LOko apresentam menores quantidades de células T CD4⁺ com marcadores de ativação CD69⁺ (**Figura 9A**) e CD44⁺ (**Figura 9C**) ou o marcador de ativação ou de células T regulatórias CD25⁺ (**Figura 9E**) e células T CD8⁺ CD69⁺ (**Figura 9B**) no baço. Portanto, nossos dados relativos a diferenças fenotípicas de células T em camundongos 5-LOko e camundongos 129 durante a infecção por *T. cruzi* (**Figura 9B**), indicam que mediadores lipídicos, como os leucotrienos, participariam ativamente modulando positivamente ou negativamente a ativação de células T. Tem sido descrito que o papel dos Leucotrienos sobre as células T poderia ser direto ou indireto, sendo que na maioria dos modelos

as ações diretas modulariam positivamente os linfócitos T e as ações indiretas modulariam negativamente as células T.

De fato, foi demonstrado que linfócitos T podem produzir LTB₄ (ATLURU et al., 1986), LTC₄ (AMBRUS et al., 1988) e LTD₄ (HOJO et al., 2000) e as atividades exercidas por leucotrienos em linfócitos T seriam mediados predominantemente via receptores para leucotrienos BLT1 (GOODARZI et al., 2003; MIYAHARA et al., 2005) e receptores para Cis-leucotrienos CisLTR1 (SPINOZZI et al., 2004; PRINZ et al., 2005). A proliferação de Linfócitos T é potencializada por LTB₄ (PASCAL & DERREPAS, 1986) e LTC₄ (BAILEY et al., 1997). O LTB₄ seria um mediador importante para linfócitos T secretarem IL-2 (GOODWIN et al., 1986; LOS et al., 1995) e induzir de proliferação de células T responsivas a IL-2 ou células T ativadas (ATLURU & GOODWIN et al., 1986) via indução de expressão de IL-2R beta (STANKOVA et al., 1992). Importantemente tem sido mostrado que inibidores de 5-LO (SC-45662) (WEIR et al., 1991) ou antagonistas do receptor de LTB₄ (ONO-4057) (MORITA et al., 1999) bloqueiam a capacidade dos leucotrienos aumentarem a atividade proliferativa de células T e produção de IL-2, o que justificaria a redução numérica de Células T ativadas expressando os fenótipos CD4⁺CD69⁺, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD44⁺ e CD8⁺CD69⁺ verificado em animais 5-Loko infectados e possivelmente seria parte das populações que estariam contribuindo para que camundongos 5-Loko infectados apresentem uma redução numérica de leucócitos esplênicos, quando comparado ao número de células verificadas em camundongos controles infectados (dados não mostrados).

De forma importante, a ausência de LTC₄ em camundongos 5-Loko, poderia explicar a redução da expressão de CD44 em células CD4⁺, pois, LTC₄ estimulam a migração e expressão de CD44 em linfócitos T para sua localização “homing” em órgãos linfóides periféricos (HONIG et al., 2003) e a sua atividade seletiva em células CD4⁺ é justificável porque diversos trabalhos demonstram que os leucotrienos poderiam modular diferentemente células T CD4⁺ e células T CD8⁺ (ROLA-PLESZCZYNSKI et al., 1982; PAYAN et al., 1984; ROLA-PLESZCZYNSKI et al., 1986; ROLA-PLESZCZYNSKI et al., 1987; GUALDE et al., 1991). Mais ainda, a reduzida expansão da população de células T CD4⁺CD25⁺ em camundongos 5-Loko, também poderiam estar relacionado à ausência de Cis-Leucotrienos como o LTC₄, porque, foi demonstrado recentemente que células T CD4⁺CD25⁺ de camundongos apresentam alta expressão mRNA para CisLTR1 e são responsivas funcionalmente na presença de Cis-leucotrienos (PRINZ et al., 2005).

O fato de animais 5-LOko infectados apresentarem ao longo da infecção menor expansão da população de células T expressando $CD4^+CD25^+$, despertou o nosso interesse em verificar se as células $CD4^+CD25^+$ poderiam ser células T regulatórias (Treg) (SAKAGUCHI & SAKAGUCHI, 1988; SAKAGUCHI et al., 1995), que modulam negativamente a resposta imune e participam do controle de células T auto-reativas, inibição da geração de resposta efetora eficiente contra tumores e patógenos (revisto em SAKAGUCHI, 2005). Deste modo em nosso modelo, à diminuição de células Treg $CD4^+CD25^+$ em camundongos 5-LOko, poderia explicar sua eficiência no controle da infecção.

No entanto, nossos resultados da análise a expressão de GITR, um marcador de Treg (SHIMIZU et al., 2002), indicam que animais 5-LOko e animais controles infectados apresentam números semelhantes de células $CD4^+CD25^+GITR^+$ no baço. Esses dados indicam que as células $CD4^+CD25^+$ aumentadas em camundongos controles infectados não são células Treg e sim células T ativadas, bem como, sugerem que células Treg não seriam as responsáveis pela resistência ao parasito circulantes em animais 5-LOko, o que corroboram com os achados recentes onde foi demonstrado que células Treg $CD4^+CD25^+$ teriam um papel limitado durante a infecção pelo *T. cruzi* (KOTNER & TARLENTON, 2007).

Curiosamente, verificamos que animais 5-LOko apresentam 3 vezes menos células Treg naturais $CD4^+CD25^+GITR^+$ em comparação com animais controles. Esses dados indicam que leucotrienos poderiam estar envolvidos na sua diferenciação no timo ou sua sobrevivência em órgãos periféricos como o baço. Essa possibilidade é sustentada porque leucotrienos modulam a diferenciação de timócitos (MEXMAIN et al., 1985) e células Treg $CD4^+CD25^+$ são exclusivamente de origem tímica (SAKAGUCHI & SAKAGUCHI, 1988). Mais ainda, foi mostrado que células Treg $CD4^+CD25^+$ expressando $Foxp3^+$, um marcador alternativo para células Treg $CD4^+CD25^+$ (SCHUBERT et al., 2001; HORI et al., 2003; FONTENOT et al., 2003), apresentam elevada expressão de mRNA para *CisLTR1* (PRINZ et al., 2005).

No entanto, não podemos descartar a possibilidade de células T supressoras estarem atuando em nosso modelo. Historicamente os primeiros relatos sobre a atividade de leucotrienos em células T, indicaram que esses mediadores induziriam células T supressoras (ROLA-PLESZCZYNSKI et al., 1982; PAYAN & GOETZL, 1983; ATLURU & GOODWIN, 1984). No modelo de infecção por *T. cruzi* tem sido descrito a participação de células T $\gamma\delta^+$ supressoras (CARDILLO et al., 1993) e animais deficientes de células T $\gamma\delta^+$ ($TCR\gamma\delta$ ko) são mais resistentes

à infecção pelo parasito (LIMA & MINOPRIO, 1996). Recentemente foi mostrado que Cis-Leucotrienos estimulam a migração de células T $\gamma\delta^+$ via CisLTR1 (PRINZ et al., 2005), demonstrando claramente o envolvimento destes mediadores lipídicos na atividade funcional destas células. Em nosso modelo, onde há ausência de leucotrienos e Cis-Leucotrienos, os animais são mais resistentes, como, verificado em animais TCR $\gamma\delta$ ko (LIMA & MINOPRIO, 1996) e apresentam redução numérica de células T $\gamma\delta^+$ (dados não mostrados).

Ainda com relação às células da resposta imune adaptativa, é conhecido que células B produtoras de anticorpos têm grande importância no controle do *T. cruzi* (KIERSZENBAUM & HOWARD, 1976; CORSINI et al., 1982) ou mesmo como células produtoras de citocinas (MONTES et al., 2006). Os resultados da análise de células B, através do marcador CD19, indicam que camundongos 129 infectados apresentam uma expansão destas células no início da infecção, que diminuem gradativamente no decorrer da infecção (**Figura 10A**). Estes dados estão em concordância com observações anteriores demonstrando que durante a fase inicial da infecção por *T. cruzi*, há uma fase transitória com ativação/expansão policlonal (MAYOR-WITHNEY et al., 1978; SANTOS-BUCH, 1979; ORTIZ-ORTIZ et al., 1980) que resulta na refratariedade destas células responderem a antígenos exógenos (MURRAY et al., 1973) e começam a expressar Fas e FasL (ZUNIGA et al., 2000) e entram em apoptose espontaneamente “Fratricide” (ASKONAS et al., 1979; ZUNIGA et al., 2000) ou induzidos, via produção de PGE₂, por células mielóides supressoras “Natural suppressor cells” Gr1⁺CD11b⁺ (ZUNIGA et al., 2005).

No entanto, as análises dos níveis séricos de anticorpos da classe IgG específicos para o parasito no 19º e 26º dias de infecção demonstram claramente que animais 129 infectados produzem anticorpos predominantemente da classe IgG2a, mas não IgG1 e seus níveis séricos aumentam com o decorrer da infecção. Esses dados estão em concordância com os dados anteriores, demonstrando que animais infectados com o *T. cruzi* estimulam células B para diferenciarem em plasmócitos secretores de IgG2a, mas, não IgG1 (SPINELLA et al., 1992; ROWLAND et al., 1992; POWELL & WASSON, 1993). Esses dados também poderiam indicar que a redução de Linfócitos B CD19⁺ verificadas nessa fase da infecção correlacionaria em parte com a gradual diferenciação de células B em plasmócitos secretores de anticorpos, nesse sentido, há evidências consistentes que plasmócitos deixam de expressar CD19 (CALLIGARIS-CAPPIO et al., 1985; JACKSON et al., 1988).

Por outro lado, camundongos 5-LOko infectados, embora apresentem um menor aumento de células CD19⁺ no 5º de infecção e uma discreta redução numérica no 12º dia de infecção, em fases mais tardias como verificado para o 26º dia de infecção, não apresentam redução de células CD19⁺, ao contrário, possuem um aumento de células B (**Figura 10A**). Estes dados indicam que, diferentemente dos animais controles infectados, os animais deficientes de Leucotrienos apresentam uma deficiência para levar a diferenciação de células B para plasmócitos, de fato, verificamos que animais 5-LOko, no 26º dia de infecção, apresentam níveis séricos reduzidos de anticorpos IgG e IgG2a. Ainda poderíamos especular que o fato das células B CD19⁺ estarem diminuídas no 12º dia de infecção em animais 5-LOko e produzirem menos IL-10, poderia implicar na possível ausência de células B1 produtoras de IL-10 (MINOPRIO et al., 1991; MINOPRIO et al., 1993).

O papel dos leucotrienos em células B tem sido pouco estudado e geralmente em modelos *in vitro*. Foi demonstrado que células B expressam LOX (JAKOBSSON et al., 1991) e produzem LTB₄ (ODLANDER et al., 1989; JAKOBSSON et al., 1991; WERZ et al., 2000) e o LTB₄ modularia células B potencializando sua ativação, indução de expressão de CD23 e proliferação (YAMAOKA et al., 1989) via IL-4 (DUGAS et al., 1990) e diferencia-las para produção de anticorpos (YAMAOKA et al., 1994), bem como, estimularia as células B para produção de anticorpos com maior afinidade para o Antígeno (PHILLIPS, 1991). O LTD₄ também modularia positivamente células B ativadas de maneira T dependente, potencializando a diferenciarem em plasmócitos via sinalização do CD40 (LAMOUREUX et al., 2006).

Ainda com relação à redução gradual de células CD19⁺ em animais controles infectados, Zuniga e colaboradores (2005) demonstraram que durante a fase aguda da infecção há uma significativa redução do número de células B imaturas decorrente da apoptose induzidas por células mielóides supressoras Gr-1⁺CD11b⁺ dependente de PGE₂. Estes dados sugerem que células CD11b⁺ poderiam estar envolvidas em parte com redução de células CD19⁺ observada em animais 129 com 19 e 26 dias de infecção (**Figura 10A**), pois, nesse período, foi verificado um aumento significativo de células CD11b⁺ (**Figura 10E**) e PGE₂ (**Figura 1B**). Ademais, camundongos 5-LOko, com 19 e 26 dias de infecção, apresentam menor número de células CD11b⁺ (**Figura 10E**) e PGE₂ (**Figura 1B**), sendo que, neste período, verificou-se um concomitante aumento de células CD19⁺ (**Figura 10A**).

O fato de animais 5-LOko apresentarem número reduzido de células CD11b⁺, também poderiam ser explicados pela ausência de leucotrienos. Embora a expressão de CD11 em leucócitos, possa ser induzida de forma independente de leucotrienos (WEBER et al., 1997; SELLMAYER et al., 1997), em vários modelos de inflamação ou infecção tem sido mostrado que LTB₄ (SHOWELL et al., 1996; PARTRICK et al., 1997) e 5-oxo-6,8,11,14-Acido eicosatetraenoico (5-oxo-ETE) (POWELL et al., 1999) induzem a expressão de CD11b⁺ em leucócitos e a modulação da expressão de CD11b na ausência de Leucotrienos, foi confirmada utilizando o bloqueio com o antagonista de receptor para LTB₄ LY293111Na (ALLEN et al., 1996; VAN PELT et al., 1997), BIIL 284 (ALTEN et al., 2004); antagonista de receptor de Cis-Leucotrienos como o Montelukast (GAGRO et al., 2004); pelo tratamento concomitante de LTB₄ e CP-105,696, um antagonista de LTB₄ (SHOWELL et al., 1996) e animais deficientes de BLT1 (SCOTT et al., 2004).

Os nossos dados corroboram com as investigações realizadas *in vitro* demonstrando que leucotrienos são importantes para diferenciação de células B em plasmócitos secretores de anticorpos, bem como *in vivo*, como demonstrado recentemente nos modelos de infecção pelo *Schistosoma mansoni* (SECOR et al., 1998) e Strongiloidíase (MACHADO et al., 2005) em animais 5-LOko e Asma experimental induzida pela OVA em camundongos BLT1ko (TERAWAKI et al., 2005) e de forma importante, sugere que anticorpos da classe IgG possivelmente teriam um papel limitado na proteção do animal durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, foi descrito que o controle de parasitas circulantes não seria dependente de anticorpos (KIERSZENBAUM & PIENKOWSKI, 1979; SCOTT, 1981; TRISCHMANN, 1983; MINOPRIO et al., 1986; MINOPRIO et al., 1989b; MILLER et al., 1997; KUMAR & TARLETON, 1998).

Os dados relativos a análises fenotípicas de linfócitos T e linfócitos B indicam que a resistência em camundongos 5-LOko infectados é verificada em condições onde há uma menor ativação de Linfócitos T, Linfócitos B e ausência de redução de células T CD4⁺CD25⁺GITR⁺, células reconhecidamente envolvidas pela resistência ao parasito (KIERSZENBAUM & PIENKOWSKI, 1979; REED, 1980; KIERSZENBAUM & HOWARD, 1976; CORSINI et al., 1982; KOTNER & TARLENTON, 2007). No entanto, devemos deixar claro que isso não implica que essas células não sejam importantes e não sejam funcionais, pois, os linfócitos são células fundamentais para a geração e manutenção de uma resposta imune protetora ao parasito

(MINOPRIO et al., 1987; RUSSO et al., 1988; ARAÚJO, 1989; ROTTENBERG et al., 1992; TARLETON et al., 1992; HOFT et al., 2000; KUMAR & TARLETON, 2001).

Os nossos dados, de forma inédita indicam claramente que leucotrienos seriam relevantes para a expansão e manutenção destas células e consequentemente estaria também afetando o seu repertório durante a fase aguda de infecção pelo *T. cruzi*. A resistência de animais 5-LOko e alteração no repertório de linfócitos é compatível com a correlação entre expansão de linfócitos e susceptibilidade a infecção pelo parasito (NOGUEIRA et al., 1981) e as alterações no padrão de citocinas produzidas durante a fase aguda nesses animais com os recentes relatos sobre alterações no repertório e função dos linfócitos T mediados pelo FasL (LOPES et al., 1995, LOPES et al., 1996; SILVA et al., 2005; COSTILLA GUILHERMO et al., 2007).

O marcador Gr-1 (Ly-6G), é expresso preferencialmente em neutrófilos maduros e imaturos, sub-populações minoritárias de linfócitos ativados (HESTDAL et al., 1991; FLEMING et al., 1993), determinados macrófagos ativados (HESTDAL et al., 1991) e células dendríticas plasmocitóides (NAKANO et al., 2001). Os nossos resultados indicam que no início da infecção (5 dias), animais 129 infectados apresentam um maior número de células Gr-1⁺ comparados aos 5-LOko infectados. O número reduzido de células Gr-1 em camundongos 5-LOko infectados poderia ser devido à ausência de leucotrienos, já que tem sido descrito que LTB₄ (HEBERT et al., 1996) via BLT1 (MURRAY et al., 2003) bloqueiam a apoptose de neutrófilos e a indução de apoptose são induzidos pelo tratamento com antagonista de receptor de Leucotrienos como SB201146 (LEE et al., 1999) e CP-105,696 (MURRAY et al., 2003); drogas que inibem a 5-LO como o BWA4C e inibidores da proteína ativadora da 5-LO (FLAP) como o MK-886 (LEE et al., 1999).

No 12º dia de infecção, animais 5-LOko, diferentemente dos animais controles, apresentam um grande aumento da população Gr-1⁺ (**Figura 10C**). Estes dados sugerem que células Gr-1⁺ seriam importantes durante a infecção por *T. cruzi* em animais 5-LOko infectados, pois este aumento ocorre justamente quando aparecem parasitas circulantes nestes animais e comparado com animais controles estão bastante reduzidos (**Figura 1A**). Deste modo, a presença de células Gr-1⁺ em camundongos 5-LOko infectados poderia estar contribuindo para a eliminação dos parasitas, levando a uma redução drástica no segundo pico de parasitemia.

Essa possibilidade é reforçada, pois trabalhos anteriores demonstraram que neutrófilos (reconhecidamente como as principais células Gr-1⁺) são importantes para o controle de parasitas

circulantes (VILLALTA & KIERSZENBAUM, 1983; CARDONI et al., 1985). De fato, foi demonstrado que a depleção de células Gr-1⁺ através do anticorpo monoclonal RB6-8C5 em animais infectados leva a exacerbação da doença e aumento do número de parasitas circulantes (CHEN et al., 2001). Resultados mostrando a relevância de células Gr-1⁺ na infecção por protozoários, usando como modelo a depleção *in vivo* de células Gr-1⁺, também foram demonstrados na infecção pelo *Toxoplasma gondii* (SAYLES & JOHNSON, 1996).

No entanto, se os Leucotrienos são importantes para retardar a apoptose de células Gr-1⁺ como os neutrófilos; quem estaria mantendo estas células vivas e funcionais na ausência destes mediadores lipídicos? Uma possibilidade seria o GM-CSF, que semelhantemente ao LTB₄ aumentam a sobrevivência de neutrófilos (LEE et al., 1999; MURRAY et al., 2003). E isso parece ser possível, pois, o GM-CSF apresenta atividade estimuladora sobre células fagocíticas para atividade tripanocida (MORRISSEY et al., 1989) é produzido rapidamente nos primeiros dias de infecção pelo *T. cruzi* (TAKASU et al., 1990) e se mantém em níveis bastante elevados durante a parasitemia e o bloqueio *in vivo* do GM-CSF, pelo tratamento com anticorpos monoclonais anti-GM-CSF, antecipa o aparecimento da parasitemia e aumenta a mortalidade dos animais (OLIVARES FONTT et al., 1996). Neste mesmo trabalho os autores demonstraram que o tratamento com GM-CSF reduz significativamente a parasitemia e morte dos animais (OLIVARES FONOTT et al., 1996).

No modelo de *Toxoplasma gondii* foi demonstrado que neutrófilos Gr-1⁺ seria uma importante fonte de IL-12 (BLISS et al., 2000). Coincidentemente, os níveis de IL-12 em animais 5-LOko na fase inicial da infecção estão elevados. Assim, podemos especular que possivelmente as células Gr-1⁺ poderia ser uma das células envolvidas na produção de IL-12 em nosso modelo.

O marcador Gr-1 também pode estar presente em células CD11b⁺ (APOLLONI et al., 2000; GONI et al., 2002), que estão aumentadas em camundongos controles infectados com *T. cruzi* na fase mais avançada da infecção como verificado no 19° e 26° dias, período onde verificamos uma grande mortalidade destes animais. Embora não tenhamos dados com dupla marcação poderíamos especular que parte das células CD11b⁺ poderiam ser Gr-1⁺CD11b⁺. A possibilidade de células Gr-1⁺CD11b⁺ estarem associados à morte dos animais seria porque estas células induzem imunossupressão (APOLLONI et al., 2000; GONI et al., 2002) e secretam NO (MAZZONI et al., 2002), que estão bastante aumentadas nestes animais. Ao contrário, animais

5-LOko não apresentam mortalidade significativa nessa fase da infecção e apresentam números reduzidos de células CD11b⁺ e níveis reduzidos de NO.

A análise de células Gr-1⁺CD11c⁺, um marcador de células dendríticas plasmocitóides (SORG et al., 1999; ITO et al., 1999; NAKANO et al., 2001), mostra que esta população está aumentada nos animais 129 infectados na fase inicial da infecção (5º dia) e reduz drasticamente à medida que a infecção avança e começa aumentar um pouco somente no final da fase aguda (26º dia). Ao contrário, animais 5-LOko infectados apresentam um grande aumento destas células no 12º dia de infecção e permanece com números elevados até o 19º dia (**Figura 10D**). Estes dados sugerem que as células Gr-1⁺CD11c⁺ poderia ser parte integrante das células Gr-1⁺, que também estão aumentadas neste período (**Figura 10C**) e estariam contribuindo para o controle mais eficiente do número de parasitas circulantes em camundongos 5-LOko infectados.

Uma possibilidade seria que as células dendríticas Gr-1⁺CD11c⁺ estariam produzindo IL-12, uma citocina importante no controle da infecção pelo *T. cruzi* (ALIBERTI et al., 1996). De fato, têm sido descrito que células dendríticas Gr-1⁺CD11c⁺ são grande produtoras de IL-12 (GRAGE-GRIEBENOW et al., 2001; DALOD et al., 2002) e nossos dados indicam que animais 5-LOko infectados (12º e 19º dias) apresentam níveis aumentados de IL-12 (**Figura 7C**) e elevação numérica de células Gr-1⁺CD11c⁺ (**Figura 10D**). Em concordância com esta possibilidade, em outro modelo de resistência a infecção, foi mostrado que animais 5-LOko infectados com *Mycobacterium tuberculosis* apresentam números aumentados de células CD11c⁺IL-12⁺ nos pulmões (BAFICA et al., 2005). Mais ainda, na infecção pelo *Toxoplasma gondii*, a depleção de células dendríticas produtoras de IL-12 torna o animal susceptível aumentando a mortalidade dos animais (LIU et al., 2006).

Uma outra contribuição das células dendríticas Gr-1⁺CD11c⁺ para o controle do parasito em animais 5-LOko, seria produzindo IFN- γ , pois, o pico de produção desta citocina que ocorre no 12º dia de infecção, correlaciona com a fase onde encontramos o maior aumento de células dendríticas Gr-1⁺CD11c⁺. Esta correlação poderia ser verdadeira, pois, células dendríticas plasmocitóides expressando CD11c seriam as únicas células dendríticas capazes de produzir elevadas quantidades de IFN- γ (PELAYO et al., 2005).

A análise do marcador F4/80, uma molécula expressa predominantemente em macrófagos maduros/ativados, mostrou que somente camundongos controles apresentam um grande aumento de células F4/80⁺ no 5º dia de infecção (**Figura 10B**). Estes dados indicam que possivelmente

estas células seriam as responsáveis pela secreção de $\text{TNF-}\alpha$, que estão aumentadas nestes animais, pois, foi demonstrado que o Trypanosoma estimulam macrófagos para produção desta citocina (KELLER et al., 1994). Os camundongos controles mantêm elevado o número de células F4/80^+ durante todo o período analisado, embora ocorra uma discreta redução (12° e 19° dia de infecção), quando comparado aos números verificados no 5° dia de infecção. Por outro lado, camundongos 5-LOko infectados não aumentam o número de células F4/80^+ na fase inicial da infecção e aumentam gradativamente células F4/80^+ e as mantêm elevadas durante o período analisado (26° dia de infecção) (**Figura 10B**). Estes dados mostram que o número aumentado de células F4/80^+ coincide com o período em que há parasitas circulantes, indicando um possível envolvimento destas células no controle do número de parasitas circulantes.

A relevância de macrófagos F4/80^+ na resistência/proteção do hospedeiro foi demonstrada em diversos modelos como na infecção de camundongos com protozoários como *Leishmania major* (SUNDERKOTTER et al., 1993) e *Plasmodium chabaudi* (SU & STEVENSON, 2000); bactéria como o *Mycobacterium bovis* – BCG (GORDON et al., 1994) e Burkholderia pseudomallei (HAQUE et al., 2006) e tumores como o Fibrosarcoma, após administração de vacinas gênicas carreando PAMPs de *Salmonella typhimurium* (PAGLIA et al., 1998). Especificamente na infecção pelo *T. cruzi*, foi demonstrado que macrófagos interagem com o parasito *in vitro* (DVORAK & SCHMUNIS (1972), formas sanguíneas (MIDLER et al., 1973) e são consideradas as principais células responsáveis pela remoção e destruição de parasitos circulantes (SCHMUNIS et al, 1973; KIERSZENBAUM et al., 1974; HOFF, 1975).

Em trabalhos com infecção por *Toxoplasma gondii*, tem sido verificado que a presença de células dendríticas $\text{F4/80}^+ \text{Gr-1}^+$ são críticos para o controle do parasito, pela elevada capacidade de produzir IL-12 (MORDUE & SIBLEY, 2003), bem como, células dendríticas $\text{CD11c}^+\text{F4/80}^+$ produtoras de IL-12 (FISHER et al., 2000). Esses dados nos fazem especular, que possivelmente as células F4/80^+ aumentadas a partir do 12° dia de infecção em animais 5-LOko infectados, seriam em parte, também células dendríticas Gr-1^+ , assim o gradativo aumento de IL-12 ao longo da infecção verificado nestes animais a partir do 12° dia de infecção seriam produzidas por células $\text{F4/80}^+ \text{Gr-1}^+$. Mais ainda, existiria a possibilidade das células F4/80^+ aumentadas em animais 5-LOko infectados no 12° dia de infecção, estarem envolvidos na produção de $\text{IFN-}\gamma$, que em nosso modelo, está bastante aumentada. Nesse sentido foi demonstrado que macrófagos F4/80^+ secretam $\text{IFN-}\gamma$ após estimulação com IL-12 (PUDDU et al., 1997; WANG et al., 1999).

Curiosamente células F4/80⁺ e células CD11c⁺ estão aumentadas em nosso modelo de infecção onde há deficiência de Leucotrienos, fato que também foi verificado em animais 5-LOko infectados com *Mycobacterium tuberculosis* (BAFICA et al., 2005), portanto, sugerindo que Leucotrienos poderiam estar envolvidos em sua regulação.

Os dados relativos às células da Resposta Imune Inata sugerem que células Gr-1⁺, F4/80⁺ e Gr-1⁺CD11c⁺ poderia estar envolvidos na resistência dos animais 5-LOko durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*. Estes resultados são de extrema importância, pois, indicam que a resistência à infecção estaria relacionado à expansão de células dendríticas plasmocitóides Gr-1⁺CD11c⁺, uma célula especializada em secretar um padrão específico de citocinas do Tipo 1 (Th1) como a IL-12 e IFN- γ , que apresentam potente atividade estimuladora em células fagocíticas como Macrófagos (F4/80⁺) e Neutrófilos (Gr-1⁺).

Nossos resultados demonstram que no período onde começam aparecer formas circulantes do parasito, os animais infectados apresentam números aumentados de células F4/80⁺, mas não células Gr-1⁺, indicando que predominantemente macrófagos poderiam estar envolvidos na controle de parasitos. Assim, avaliamos a capacidade de macrófagos peritoneais provenientes de animais controles ou animais deficientes em 5-LOko, ativados via IFN- γ e LPS, quanto à capacidade de adesão e indução de morte do parasito *in vitro*.

5.3. Interação e Atividade Tripanocida de Macrófagos

De forma importante, observamos que macrófagos de animais 5LOko apresentam maior número de tripomastigotas associados a sua membrana, sugerindo que a ausência de leucotrienos estaria modulando positivamente a expressão de moléculas envolvidas no reconhecimento/adesão do parasito. A interação do parasito com as células do hospedeiro, entre eles o macrófago é um sistema complexo dependente tanto de glicoproteínas e gicolípidos (DE ARAÚJO JORGE & SOUZA, 1984). Assim, macrófagos ativados na ausência de leucotrienos poderiam ter uma expressão aumentada de moléculas sensíveis à ação de neuroaminidase do parasito (LIBBY et al., 1886) ou mesmo moléculas que reconhecem as glicoproteínas gp-35 e gp-55 (YOSHIDA et al., 1989) e gp-82 (RAMIREZ et al., 1993) do parasito ou mesmo uma maior expressão de polipeptídios de 32 e 34kD (DAVIS & KUHN, 1990), Lectinas do tipo-C (IIDAET al., 1999), que reconhecem resíduos de N-Acetil galactosamina (BONAY & FRESNO, 1995) ou galactose

reconhecidos por trans-sialidases inativas (lectina-like) de parasitos (CREMONA et al., 1999; SILBER et al., 2002).

Um outro fato interessante observado neste trabalho foi que a adição de inibidores de Óxido Nítrico Sintase (NOS) com o L-NAME, aumentam a capacidade de interação de tripomastigotas por macrófagos ativados de animais controles. É conhecido que macrófagos estimulados com LTB₄ ou LTC₄ produzem NO (SEREZANI et al., 2006) ou estimulados com IFN- γ e LTB₄ secretam maiores quantidades de NO, bem como que, o bloqueio prévio de macrófagos com antagonistas do receptor de LTB₄, inibe a capacidade do IFN- γ induzir macrófagos para produção de NO (TALVANI et al., 2002). Esta última evidência demonstra que possivelmente em nosso sistema, o IFN- γ poderia estar levando a produção de LTB₄ que sinergicamente com IFN- γ e o LPS via receptor Toll-like 2 (TLR2) (MATSUGUCHI et al., 2000; CAMPOS et al., 2001), dependente do fator 88 de diferenciação Mielóide (MyD88) poderiam estar levando a produção de NO.

Esta evidência é muito importante, pois, implicam que o LTB₄ poderia estar sendo produzido por macrófagos ativados de animais controle. Em outros modelos de adesão de leucócitos às células endoteliais, tem sido demonstrado que LTB₄ estimula células endoteliais permitindo a adesão de leucócitos (RENKONEN et al., 1988) distintos de ICAM-1 (RENKONEN, 1989) via indução de NO e o pré-tratamento de vênulas do mesentério com L-NAME aumenta significativamente a adesão de leucócitos ao endotélio e este efeito é abolido pelo pré-tratamento com antagonista de receptor de LTB₄ (SC41930) (ARNDT et al., 1993). O fato do L-NAME estar aumentando a adesão de leucócitos às células endoteliais é o mesmo que verificamos com macrófagos ativados tratados com L-NAME reconhecerem tripomastigotas, sugerindo que as moléculas envolvidas na interação leucócitos-células endoteliais e interação Macrófagos-*T. cruzi* seriam moduladas negativamente pelo óxido nítrico.

Surpreendentemente o tratamento de macrófagos ativados de animais 5-LOko com L-NAME reduziu drasticamente a capacidade dos macrófagos reconhecerem o *T. cruzi*, sugerindo que na ausência de Leucotrienos os sinais mediados pelo IFN- γ e LPS possibilitam a produção de NO, de fato isso acontece (PELUFFO et al., 2004), que seria importante para levar essas células expressarem moléculas envolvidas no reconhecimento do parasito.

Estes dados em conjunto, indicam pela primeira vez que macrófagos ao serem sinalizados pelo IFN- γ , LPS e pelo *T. cruzi*, que pode induzir a fosforilação de resíduos Tirosina presentes na

membrana celular (RUTA et al., 1996) e ativação de proteína quinase C – PKC (VILALTA et al., 1999) em macrófagos, por exemplo, estariam permitindo a preponderância de sinais diferenciados nestes macrófagos ativados na presença ou ausência de Leucotrienos, que refletiria na capacidade funcional destas células para o reconhecimento do parasito.

Mais ainda os nossos resultados referentes à recuperação de parasitos indicam claramente que essa sinalização reflete também na capacidade destes macrófagos matarem os *Trypanosoma* intracelularmente, pois, foi verificada uma maior eficiência dos macrófagos ativados de animais 5-LOko no controle de parasitos intracelulares em comparação com macrófagos ativados de animais controles. Corroborando com nossa hipótese, verificamos que o NO é importante para a destruição do parasito intracelular por macrófagos controles, mas não, por macrófagos de animais deficientes de 5-LO.

Os dados relativos ao bloqueio por L-NAME de induzir a morte de parasitos intracelulares por macrófagos controles confirmam observações anteriores que o NO é importante para matar o parasito intracelular (VINCENDEAU & DAULOUEDE, 1991; MUNOZ-FERNANDEZ et al., 1992; GAZZINELLI et al., 1992) e que leucotrienos potencializam os macrófagos ativados para matar o parasito intracelular (WIRTH & KIERZENBAUM, 1985a; WIRTH & KIERZENBAUM, 1985b), ou o IFN- γ via produção de NO (TALVANI et al., 2002). No entanto, a produção de NO e ROS, são fenômenos interdependentes, que possibilita macrófagos produzirem as duas espécies de radicais livres (COFFEY et al, 2002). De fato, os eicosanóides podem estimular a produção de ROS em macrófagos ativando a NADPH oxidase (SELLMAYER et al., 1996), bem como, a ativação de oxigenases como lipoxigenase, cicloxigenase (SELLMAYER et al., 1996; MCLNTYRE et al., 1999) e leucotrienos (LTB₄) e cis-Leucotrienos (LTC₄ e LTD₄) estimulam macrófagos alveolares para produção de ROS (COFFEY et al, 2002; SEREZANI et al., 2005), via BLT1 (SEREZANI et al., 2005). Ainda, diversos trabalhos demonstraram que ROS são importantes para o macrófago matar o parasito (ROFF, 1976; NOGUEIRA & COHN, 1978; NATHAN et al., 1979; REED et al., 1987; GOBERT et al., 1998) e linhagens de macrófagos deficientes na geração de ROS são ineficientes em eliminar o parasito (TANAKA et al., 1983). Assim, é perfeitamente possível a co-existência destes agentes oxidantes na destruição do parasito por macrófagos ativados de animais normais.

Se os macrófagos de animais normais produzem eficientes mecanismos tripanocida fica a seguinte pergunta: Por que eles não conseguem matar o parasito de forma eficiente? Essa

pergunta é sedutora, mas, no momento só podemos especular que esses macrófagos ao serem ativados estimulariam cascatas de ativação, que seria mediado por metabólitos da 5-LO, pois, apresenta diferença na expressão de moléculas para o reconhecimento do parasito aos verificados em macrófagos deficientes de 5-LO. Assim, possivelmente esses macrófagos seriam mais sensíveis a ação de PGE₂ para inibir a produção de TNF- α (BORGES et al., 1998) ou mesmo produzirem IL-10 (STRASSMANN et al., 1994; FREIRE-DE-LIMA et al., 2000) e assim não apresentarem capacidade plena para destruição do parasito. Ainda a PGE₂ e o NO nestas células poderiam induzir a heme oxygenase (HO)-1, impedindo que elas morram (CHEN et al., 2002). A IL-10 produzidas por estas células poderiam também causar um desequilíbrio no metabolismo da arginina levando a produção preferencial de poliaminas como a putrescina, permitindo que parasita possa crescer (FREIRE-DE-LIMA et al., 2000).

Os nossos resultados de forma pioneira demonstram que na ausência de leucotrienos, macrófagos ativados são estimulados de forma diferenciada para reconhecimento do parasito dependente de NO e para destruição intracelular do parasito de forma muito eficiente, por uma via distinta, independente de NO, o que justificaria os nossos resultados *in vivo* demonstrando uma maior eficiência de animais 5-LOko controlarem a parasitemia durante a fase aguda da doença e validam observações anteriores que mediadores distintos do NO estão envolvidos na destruição intracelular do *T. cruzi* pelo macrófago (NATHAN et al., 1979; REED et al., 1987; DAMATTA et al., 2000) que foram confirmadas em camundongos iNOS-ko (CUMMINGS & TARLETON, 2004).

Embora não tenhamos realizado experimentos comprobatórios, acreditamos que o fato de macrófagos provenientes de animais 5-LOko serem eficientes para matar o parasito independente de NO, estaria relacionado à estimulação pelo IFN- γ tanto *in vitro* como *in vivo*, que estão aumentados na fase da infecção onde há parasitas circulantes e verificamos uma eficiência destes animais em seu controle. Essa possibilidade é sustentada por estudos recentes demonstraram que a deficiência da proteína 47GTPase (LRG-47) induzida pelo IFN- γ torna os animais LRG-47ko bastante susceptíveis a infecção pelo *T. cruzi* e os macrófagos destes animais embora apresentem alta expressão de mRNA para iNOS perdem completamente a habilidade para matar o parasito intracelularmente (SANTIAGO et al., 2005), portanto, por hipótese estes macrófagos também não apresentariam a maquinaria para a destruição do parasito, verificados em nosso modelo.

Deste modo, poderíamos especular que a eficiência dos macrófagos dos animais 5-LOko na destruição do parasito, seria dependente de IFN- γ como demonstrados anteriormente como espécies reativas do oxigênio (ROS) (NATHAN et al., 1979; REED et al., 1987) ou mesmos outros mecanismos estimulados pelo IFN- γ , demonstrado em outros modelos, que seriam independentes de ROS e RNI *in vitro* (CATTERALL et al., 1987; HALONEN & WEISS, 2000) via Ubiquitina (HIEMSTRA et al., 1999), limitando o conteúdo intracelular de íons Ferro (Murray et al., 1991) ou via Peptídeos antimicrobianos (MCGWIRE et al., 2003; BOULANGER et al., 2006) e *in vivo* (BLANCHARD et al., 2003; GILLMAN et al., 2004; LOEWENICH et al., 2004).

Finalmente, especulamos sobre um possível modelo hipotético fundamentado no conjunto de dados obtidos neste trabalho para destruição efetiva do parasito intracelular por macrófagos de animais 5-LOko. Durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* na ausência de leucotrienos, possivelmente outros mediadores como ROS poderiam estar matando os parasitos circulantes. Os animais 5LOko tem níveis de IFN- γ aumentados exatamente no período que começam aparecer parasitas circulantes e IFN- γ ativa a NADPH oxidase em macrófagos (KIKUCHI et al., 1996) e estimulam macrófagos para atividade tripanocida (WIRTH et al., 1985). Bem como, tem níveis detectáveis de TNF- α e IL-1 β que também ativa a NADPH oxidase em diversos tipos celulares (RHEE et al., 2000), inclusive macrófagos (ROTHWARF et al., 1999; GHOSH & KARIN, 2002; JEFFERLES et al., 2001; FREY et al., 2002; LI et al., 2002; GU et al., 2003).

Mais ainda, os macrófagos do baço são fundamentais na remoção e destruição de parasitas circulantes durante a fase aguda (CORDEIRO et al., 1996; UMEKITA et al., 1999; GUARNER et al., 2001). Ao interagir com a célula do hospedeiro, formas tripomastigotas de *T. cruzi* liberam fatores solúveis (TARDIEUX et al., 1994; BURLEIGH & ANDREWS, 1995) que ativam a enzima fosfolipase C do hospedeiro, culminando na mobilização de Ca²⁺ de estoques intracelulares e geração de diacilglicerol (DAG) (RODRIGUEZ et al., 1995) e a estimulação de PKC durante a interação parasito-macrófago (VILALTA et al., 1999) e deste modo levaria a ativação da NADPH oxidase. De fato, a infecção de macrófagos leva a expressão de NADPH oxidase na membrana celular e associada às vesículas contendo parasitas internalizados (DE CARVALHO & DE SOUZA, 1987).

Ainda, tem sido demonstrado que PAMPs de *T. cruzi* ancorados em Glicosilfosfatidilinositol (GPI) e glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs) poderiam associar a TLR2

expressos em macrófagos (CAMPOS et al., 2001), potencializando a ação de IFN- γ (CAMARGO et al., 1997) para a ativação da NADPH oxidase. A sinalização via PAMP-TLR2 é dependente de uma proteína adaptadora intracelular MyD88 (MCGETTRICK & O'NEILL, 2004) e animais deficientes de MyD88 tornam-se muito susceptíveis na fase aguda da infecção por *T. cruzi*, com mortalidade precoce e baixo índice de sobrevivência, associados a uma incapacidade dos macrófagos tornarem-se ativados para produção plena de citocinas, NO e matar o parasito, pela reduzida capacidade de fosforilar a Proteína kinase via ERK1/2 e p38MAPK (CAMPOS et al., 2001), que na forma ativa fosforila a subunidade p47phox ativando NADPH oxidase (EL BENNA et al., 1996; DEWAS et al., 2000). De fato, foi demonstrado, posteriormente, que o MyD88 é importante para a ativação da p38MAPK e ativação da NADPH oxidase em macrófagos para produção de íons $O_2^{\bullet -}$ (MATSUZAWA et al., 2005; LAROUX et al., 2005).

A IL-1 e IL-6 aumentadas em animais 5-LOko infectados poderiam estimular também a produção de hepcidina por hepatócitos (PARK et al., 2001) ou mesmo macrófagos (LEE et al., 2005; INAMURA et al., 2005; WRIGHTING & ANDREWS, 2006). A Hepcidina é uma proteína de fase aguda que controla a homeostase de ferro no organismo e induz o seqüestro de Fe^{2+} por macrófagos (ATANASIU et al., 2006). Altas concentrações de ferro intracelular em células fagocíticas são tóxicas e capazes de matar microrganismos internalizados por sua capacidade de gerar radicais $\bullet OH$ a partir de H_2O_2 , através da reação de Fenton (GOLDSTEIN et al., 1993). Curiosamente em lamínas de células aderentes do baço de animais infectados verificamos a presença muito maior de ferro intracelular em células aderentes de animais 5-LOko (dados não mostrados). Ainda, nesse modelo, verificamos que essas células vivem aderentes por mais tempo em cultura que as células aderentes de animais infectados controles (Dados não mostrados). Esses dados poderiam explicar o número aumentado de células F4/80⁺ verificados nos animais 5-LOko.

Os dados obtidos neste trabalho indicam que metabólitos gerados pela 5-LO modulam negativamente a geração de uma resposta protetora durante a fase aguda de infecção pelo *T. cruzi* e são diferentes dos dados implicando a LTB_4 potencializando o efeito dos macrófagos primados para atividade tripanocida dependente de NO e que tratamento *in vivo* com antagonista do receptor LTB_4 (BLT1), (CP-105,696) em animais infectados, onde demonstraram que há um aumento de parasitemia nestes animais (TALVANI et al., 2002). Uma possível explicação para esta discrepância seria que por hipótese o tratamento com CP-105,696 estaria levando ao

bloqueio somente do LTB₄ via BLT1, no entanto, em nosso modelo, também poderia ser pela ausência de estimulação em receptores BLT2, de fato tem sido descrito que BLT1 e BLT2 podem estar expressos concomitantemente na maioria das células do sistema imune (YOKOMIZO et al., 2001), mais ainda, o nosso modelo implica na ausência de Cis-LTs como a LTC₄ e LTD₄ e outras como a LXA₄ e mesmo assim, os macrófagos primados conseguem controlar eficientemente o parasito por uma via distinta de NO. Deste modo, as comparações ficam extremamente prejudicadas não só em modelos de inibição farmacológica ou genética de BLT1. Ainda, os dados relativos ao efeito verificados em animais infectados com *M. tuberculosis* em animais 5-LOko (BAFICA et al., 2005), são opostos aos obtidos com inibidores da FLAP, como o MK886 (PERES et al., in press), indicando que a inibição farmacológica é diferente de uma inibição geneticamente induzida onde o animal não produz leucotrienos desde a formação do zigoto.

Ainda nossos dados na infecção aguda pelo *T. cruzi*, corroboram com observações anteriores que na ausência de leucotrienos em modelos de infecção/inflamação há um aumento de produção de citocinas do tipo 1 como a IL-12 e IFN- γ , como verificado para Fibrose Pulmonar (PETERS-GOLDEN et al., 2002), *S. Mancini* (CECO et al., 1998), *T. gondii* (ALIBERTI et al., 2002b), *M. tuberculosis* (BAFICA et al., 2005) e *S. venezuelensis* (MACHADO et al., 2005).

A correlação entre ausência de leucotrienos, maiores níveis de citocinas tipo 1 e resistência a infecção tem sido verificado neste trabalho e no modelo de *M. tuberculosis* (BAFICA et al., 2005), embora, no modelo de *T. gondii* (ALIBERTI et al., 2002b) também tenha sido verificado o aumento de citocinas do tipo 1, diferentemente dos animais infectados com *T. cruzi*, os animais infectados morrem mais precocemente. Essa aparente contradição pode ser porque em *T. gondii*, foi observado que esses animais produzem altos níveis de TNF- α e níveis altíssimos de NO, o que levariam os animais a morte, ao contrario, embora os níveis de TNF- α possam estar envolvidos na morte precoce de parte dos nossos animais 5-LOko, os níveis de NO em nossos animais são semelhantes ou inferiores aos verificados em animais controles e a maioria controla eficientemente o parasito. Ainda, um fato importante é que diferente do *T. gondii*, o *T. cruzi* apresenta parasitemia e faz com que tenha características semelhantes a um quadro de sepse, de fato, a maior sobrevivência de animais 5-LOko com sepse (BENJAMIM et al., 2005) e o maior sobrevivência durante a fase aguda de infecção pelo *T. cruzi*, parecem estar relacionados com a ausência de CisLTs. Ainda, a capacidade de animais deficientes de

leucotrienos elaborarem uma resposta preferencialmente Th1, explicaria à susceptibilidade as infecções pelo *S. mansoni* (SECOR et al., 1998) e *S. venezuelensis* (MACHADO et al., 2005).

Finalmente foi mostrado recentemente que LTB₄ e LTD₄ são capazes de estimular a atividade Leishmanicida em macrófagos elicitados com tioglicolato, via indução de NO e que os efeitos dos leucotrienos são bloqueados por inibidores de FLAP (MK0591) ou antagonistas de receptor BLT1 (U57302) e inibidores de NOS (L-NAME) (SEREZANI et al., 2006). Esses dados diferem dos nossos, possivelmente porque os nossos macrófagos, embora tenham sido obtidos do peritônio, são macrófagos residentes e não foram elicitados pelo tioglicolato, mas, estimulados *ex vivo* com IFN-γ e LPS, um modelo clássico de ativação de macrófagos que podem secretar ROS (ADAMS & HAMILTON, 1987) e NO (IYENGAR et al., 1987), enquanto que, macrófagos elicitados com tioglicolato estimulados com PMA não secretam ROS (NOMIZO – Tese de mestrado), mas, quando estimulados com IFN-γ e LPS (STUHR et al., 1989; COX et al., 1992), IFN-γ e *S. mansoni* (OSWALD et al., 1992) secretam NO, portanto, são macrófagos com níveis de ativação diferentes e poderiam refletir em uma maior ou menor resposta aos leucotrienos. Ainda, em nosso modelo a atividade tripanocida dos macrófagos ativados de animais 5-LOko seriam por um mecanismo independente de NO e de fato Talvani e cols. 2002, mostraram claramente que o antagonista do receptor BLT1 não afeta macrófagos estimulados pelo IFN-γ para atividade tripanocida. Mais ainda, os animais controles, que poderiam produzir leucotrienos pela estimulação com IFN-γ e LPS, são ineficientes em matar o parasito e a sua atividade tripanocida é exacerbada pela presença de L-NAME, portanto, mostrando que o papel dos leucotrienos na atividade tripanocida não seria essencial, apenas potencializador.

De forma importante, os trabalhos relativos à atividade tripanocida do LTB₄ (TALVANI et al., 2002) e os descritos neste trabalho, mostraram a atividade tripanocida pela recuperação do parasito e não pela contagem de parasitos (*Leishmania*) em macrófagos após 24 horas de cultivo. O fato de ter menos *Leishmania* intracelularmente poderia ser uma consequência no reconhecimento do parasito pelos macrófagos. O trabalho mostrando a atividade Leishmanicida usou como forma infectante, promastigotas. As formas promastigotas de *Leishmania* podem utilizar diferentes receptores para entrar no macrófago como receptores para complemento e proteínas ligantes a manose (BLACKWELL et al., 1985; WILSON & PEARSON, 1986), curiosamente, formas amastigotas do *T. cruzi* são reconhecidos por proteínas ligante a manose (DOYLE et al., 1986; KAHN et al., 1996). Dados preliminares indicam que diferentemente do

que ocorre com formas tripomastigotas os macrófagos ativados de animais normais apresentam grande capacidade de adesão a formas amastigotas e macrófagos ativados de animais 5-LOko tem menor capacidade de adesão com formas amastigotas (dados não mostrados). Assim, especulamos que os resultados com *Leishmania* poderia ser por uma menor adesão e internalização do parasito.

Em relação à infecção *in vivo* com *Leishmania* em animais tratados com o inibidor de 5-LO (zileuton) ou em animais 5-LOko, mostrarem maior susceptibilidade, pela medição de edema após a infecção com o parasito é surpreendente. Em outros modelos com a infecção pulmonar pelo *H. capsulatum* e no modelo de infecção pulmonar pela *K. pneumoniae*, a deficiência de leucotrienos torna os animais susceptíveis à infecção, enquanto que, na infecção pelo *M. tuberculosis* (BAFICA et al., 2005) gera resistência. Deste modo, a única explicação possível é que diferentes patógenos por apresentar diferentes tipos de PAMPs e ciclos dentro do hospedeiro personalizado, poderiam gerar mediadores pro - inflamatórios e resposta imune adaptativa diferenciada que dependeriam mais ou menos dos leucotrienos, bem como, da atividade funcional exercida pelos leucotrienos potencializando ou modulando a resposta do hospedeiro. Ainda, guardada as diferenças de espécie, recentemente o tratamento com zileuton, em modelo de inflamação pulmonar aguda por inalação de ácaros domésticos foi mostrado que embora o tratamento reduza drasticamente os níveis de leucotrienos no aspirado brônquico, o nível de metabólitos dos leucotrienos na urina não altera significativamente, ainda verificaram que o zileuton neste modelo causa neutrofilia e aumenta os níveis de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 no sangue (LARSSON et al., 2006).

Esses dados demonstram a complexidade da resposta do hospedeiro aos patógenos, porém, demonstram a participação de mediadores lipídicos nas infecções, portanto, a necessidade de mais estudos para saber como estes mediadores atuam durante os diferentes tipos de inflamação ou infecção por patógenos.

Este trabalho demonstra pela primeira vez que leucotrienos são produzidos durante a fase aguda de infecção pelo *T. cruzi*. E que a infecção de animais deficientes em leucotrienos são mais resistentes a infecção pelo parasito, demonstrado pelo menor parasitemia, menor número de parasitismo tissular e menor mortalidade durante a fase aguda. A resistência ao *T. cruzi* em animais 5-LOko está relacionado com a habilidade de estes animais produzirem citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF- α e IL-6 e citocinas do tipo 1, como a IL-12, IFN- γ e menos

PGE₂ e IL-10, e aumento no número de células Gr-1⁺, Gr-1⁺CD11c⁺ na fase inicial da doença e números aumentados de células F4/80⁺ e número reduzido de células CD11b⁺ durante o período de investigação deste trabalho, que correlaciona com o menor número de parasitas circulantes e parasitismo tissular. Verificamos ainda que animais 5-LOko infectados apresentam menor inflamação nos tecidos infectados e redução numérica de células T ativadas com o fenótipo CD4⁺CD69⁺, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD44⁺ e CD8⁺CD69⁺, ausência de alteração numérica de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺GITR⁺ e menor capacidade para produção de anticorpos parasito-específicos do isotipo IgG2a. E demonstram pela primeira vez que leucotrienos poderiam modular a ativação de células T e células B durante a infecção pelo *T. cruzi*.

Ainda, verificamos que a maior sobrevivência em animais 5-LOko infectados está relacionada à capacidade destes animais controlarem os parasitos já na primeira parasitemia, bem como, apresentarem menor parasitemia subsequente, menores níveis de NO, LTB₄ e LTC₄ e manutenção da capacidade para produção de IL-1, PGE₂ e IL-10 e produzirem menos IFN-γ. De forma importante, demonstramos que macrófagos ativados de animais 5-LOko são mais eficientes para destruição do parasito por mecanismo independente de NO, indicando que outros mecanismos poderiam ser relevantes para a destruição intracelular do parasito. Estes dados em conjunto, indicam que mediadores lipídicos produzidos pela enzima 5-lipoxigenase, modulam negativamente a capacidade dos camundongos para geração de uma resposta imune protetora durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- Camundongos na fase aguda de infecção pelo *T. cruzi* produzem metabólitos do ácido aracdônico como PGE₂, LTB₄ e LTC₄;
- Camundongos deficientes de 5-lipoxigenase (5-LOko) apresentam capacidade para produção de PGE₂;
- Comparados aos animais controles, os animais 5-LOko apresentam parasitemia mais tardia e menor, tem menor parasitismo tissular, menor infiltrado de células inflamatórias e apresenta menor taxa de mortalidade durante a fase aguda, indicando que animais deficientes de leucotrienos são mais resistentes a infecção pelo parasito;
- A resistência ao parasito verificado em animais 5-LOko está relacionada à capacidade das células esplênicas produzirem IL-1 β e TNF- α , produzirem mais IL-6, IL-12, IFN- γ e menos PGE₂ e IL-10, e aumento de células expressando Gr-1 e CD11cGR-1 durante a parasitemia durante a parasitemia;
- A morte dos animais controles está relacionada à produção aumentada de NO, LTB₄, LTC₄, níveis maiores de IFN- γ , níveis detectáveis de IL-12 e ausência de PGE₂ e IL-10 e número elevados de parasitas circulantes;
- A maior sobrevivência dos animais 5-LOko correlaciona com manutenção da capacidade de produzir níveis detectáveis de IL-1 β , PGE₂ e IL-10 e produção reduzida IFN- γ e NO e altos níveis de IL-12 e baixíssima parasitemia;
- Animais deficientes de leucotrienos controlam o parasito em condições onde há menor número de células T esplênicas ativadas expressando os marcadores CD4⁺CD69⁺, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD44⁺ e CD8⁺CD69⁺, ausência de alteração numérica de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺GITR⁺ e menor capacidade para produção de anticorpos parasito-específicos do isotipo IgG2a;

- A resistência à infecção em animais deficientes de leucotrienos está relacionada com aumento de células F4/80⁺ e redução de células CD11b⁺ durante a fase aguda;
- Macrófagos ativados provenientes de animais deficientes em leucotrienos, apresentam maior capacidade para adesão e internalização de formas tripomastigotas e eficiente atividade tripanocida por mecanismo independente da geração de NO;
- Os resultados indicam camundongos controles não conseguem polarizar uma resposta Th1 onde há parasitas circulantes e mais tardiamente produzem de altos níveis de leucotrienos, NO e citocinas puramente Th1 estão associados à susceptibilidade ao parasita;
- Ao contrário na ausência de leucotrienos, permite a geração de uma resposta predominantemente Th1 durante a fase onde há parasitas circulantes, capazes de controlar eficientemente o parasita circulante e tissular e uma resposta mais tardia com níveis relativos altos de citocinas Th1 e níveis relativos baixos de citocinas Th2 e capacidade para produzir níveis detectáveis de PGE₂ e níveis mais baixos de NO;
- Estes dados em conjunto demonstram que mediadores lipídicos produzidos pela enzima 5-lipoxigenase, modulam negativamente a capacidade dos camundongos para geração de uma resposta imune capaz de controlar os parasitos circulantes e parasitos localizados nos tecidos, portanto, protetora durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp. Parasitol.**, v. 84, n. 2, p. 231-244, 1996.

ADAD, S. J.; ANDRADE, D. C. S.; LOPES, E. R. Contribuição ao estudo da anatomia patológica do megaesôfago chagásico. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 33, p. 443-450, 1991.

ALIBERTI, J. C.; CARDOSO, M. A.; MARTINS, G. A.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, J. S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 6, p. 1961-1967, 1996.

ALIBERTI, J.; HIENY, S.; REIS E SOUZA, C.; SERHAN, C. N.; SHER, A. Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. **Nat. Immunol.**, New York, v. 3, p. 76-82, 2002a.

ALIBERTI, J.; SERHAN, C.; SHER, A. Parasite-induced lipoxin A₄ is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. **J. Exp. Med.**, New York, v. 196, p. 1253-1262, 2002b.

ANDERSSON PO, STOCKELBERG D, JACOBSSON S, WADENVIK H. A transforming growth factor-beta1-mediated bystander immune suppression could be associated with remission of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. **Ann Hematol.** ,Berlin , v.79(9), p.507-13. 2000.

ANDRADE ZA. The pathology of Chagas disease in man. **Ann Soc Belg Med Trop.** v.65, p.15-30, 1985.

ANSELMINI, A.; MOLEIRO, F. Chagas' disease and chagasic myocardiopathies. **Arch. Inst. Cardiol. Mex.**, v. 42, n. 4, p. 622-628, 1972.

ANTÚNEZ, M. I.; CARDONI, R. L. *Trypanosoma cruzi*: the expansion of NK, T, and NKT cells in the experimental infection. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 106, p. 85-94, 2004.

ARAUJO FG. Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes. **Infect Immun.**, Washington, v.57(7), p.2246-8, 1989.

BACHMANN MF, KOPF M. Balancing protective immunity and immunopathology. **Curr Opin Immunol.**, London, v.14(4), p.413-9, 2002.

BAHIA MT, TAFURI WL, CALIARI MV, VELOSO VM, CARNEIRO CM, COELHO GL, LANA M. Comparison of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjunctival routes. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Rio De Janeiro, v.35(4), p.339-45, 2002.

BAILLY, P. et al. The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v. 25, p. 3316-3320, 1995.

BARBOSA DE OLIVEIRA LC, CUROTTO DE LAFAILLE MA, COLLET DE ARAUJO LIMA GM, DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN I. Antigen-specific IL-4- and IL-10-secreting CD4+ lymphocytes increase in vivo susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection., **Cell Immunol.**, Orlando, v.170(1), p.41-53, 1996.

BASTOS, K. R.; ALVAREZ, J. M.; MARINHO, C. R.; RIZZO, L. V.; LIMA, M. R. Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile. **J. Leukoc. Biol.**, v. 71, n. 2, p. 271-278, 2002.

BENJAMIM, C. F.; CANETTI, C.; CUNHA, F. Q.; KUNKEL, S. L.; PETERS-GOLDEN, M. Opposing and hierarchical roles of leukotrienes in local innate immune versus vascular responses in a model of sepsis. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 174, p. 1616-1620, 2005.

BIJOVSKY AT, MILDER RV, ABRAHAMSOHN IA, SINHORINI IL, MARIANO M. The influence of lymphatic drainage in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Acta Trop.**, v.41(3), p.207-14, 1984.

BORGES, M. M.; KLOETZEL, J. K.; ANDRADE, H. F.; TADAKORO, C. E.; PINGE-FILHO, P.; ABRAHAMSOHN, I. Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF-alpha production during *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol. Lett.**, v. 63, p. 1-8, 1998.

BORN W, HAPP MP, DALLAS A, REARDON C, KUBO R, SHINNICK T, BRENNAN P, O'BRIEN R. Recognition of heat shock proteins and gamma delta cell function. **Immunol. Today**, Amsterdam, v.11(2), p.40-3, 1990.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v.72, p.248-54, 1976.

BRENER Z, CHIARI E. MORPHOLOGICAL VARIATIONS OBSERVED IN DIFFERENT STRAINS OF *TRYPANOSOMA CRUZI*. **Rev Inst Med Trop**, Sao Paulo, v.19, p.220-4, 1963.

BRENER, Z. Immune response and immunopathology in *Trypanosoma cruzi* infection Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. **ISBT Brazil'92**, São Paulo, p. 31-47, 1992.

BRENER, Z. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 63, n. 2, p. 215-220, 1969.

CANÇADO, J. R. Tratamento específico da doença de Chagas. In: CANÇADO, J. R.; CHUSTER, M. **Cardiopatia chagásica**, Belo Horizonte, Fundação Carlos Chagas, 1985. p.327-355.

CARDILLO F, FALCAO RP, ROSSI MA, MENGEL J. An age-related gamma delta T cell suppressor activity correlates with the outcome of autoimmunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Eur J Immunol.**, Weinheim, v.23(10), p.2597-605, 1993.

CARDILLO, F.; CUNHA, F.Q.; TAMASHIRO, W.M.; RUSSO, M.; GARCIA, S.B.; MENGEL, J. NK1.1+ cells and T-cell activation in euthymic and thymectomized C57Bl/6 mice during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Scand. J. Immunol.**, v.55, n.1, p.96-104, 2002.

CARDILLO, F.; NOMIZO, A.; POSTOL, E.; MENGEL, J. NK1.1 cells are required to control T cell hyperactivity during *Trypanosoma cruzi* infection. **Med. Sci. Monit.**, v. 10, n. 8, p. BR259-267, 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: the role of NK cells. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 128-134, 1996.

CARDONI, R. L.; DE TITTO, E. H.; DOCAMPO, R. On the mechanism of killing of *Trypanosoma cruzi* by human polymorphonuclear leukocytes. **Experientia.**, v. 41, n. 1, p. 89-91, 1985.

CERECETTO, H.; GONZALEZ, M. Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 2, n. 11, p. 1187-1213, 2002.

CHANDRASEKAR B, MELBY PC, TROYER DA, COLSTON JT, FREEMAN GL. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. **Am J Pathol.**, Bethesda, v.152(4), p.925-34, 1998.

CHANDRASEKAR B, MELBY PC, TROYER DA, FREEMAN GL. Differential regulation of nitric oxide synthase isoforms in experimental acute chagasic cardiomyopathy. **Clin Exp Immunol.**, Oxford, v.121(1), p.112-9, 2000.

CHAPMAN WL JR, HANSON WL, WAITS VB. The influence of gonadectomy of host on parasitemia and mortality of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Parasitol.** Washington, v.61(2), p.213-6, 1975.

CHAPUIS Y. Acute Chagas' disease in children at Cochabamba (Bolivia). **Ann Soc Belg Med Trop.**, Bruxelles, v.53(6), p.581-93, 1973.

CHEN, L.; WATANABE, T.; WATANABE, H.; SENDO, F. Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, n. 1, p. 265-275, 2001.

CIESLIK, K.; ZHU, Y.; WU, K. K. Salicylate suppress macrophage nitric-oxide synthase 2 and cyclo-oxygenase-2 expression by inhibiting CCAAT/enhancer-binding protein- β binding via a common signaling pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 49304-49310, 2002.

CLARK CG, PUNG OJ. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. **Mol Biochem Parasitol.** Amsterdam, v.66(1), p.175-9, 1994.

COELHO PS, KLEIN A, TALVANI A, COUTINHO SF, TAKEUCHI O, AKIRA S, SILVA JS, CANIZZARO H, GAZZINELLI RT, TEIXEIRA MM. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. **J Leukoc Biol.**, New York, v.71(5), p.837-44, 2002.

CORDEIRO ZM, DAHIA AC, ANDRADE ZA. Kinetics of *Trypanosoma cruzi* destruction in the mouse spleen. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Rio de Janeiro, v.30(1), p.3-9, 1996.

COSTA VM, TORRES KC, MENDONCA RZ, GRESSER I, GOLLOB KJ, ABRAHAMSOHN IA. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol.**, Baltimore , v.177(5), p.3193-200. 2006.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 7, p. 4081-4089, 2004.

CUNHA-NETO, E.; DURANTI, M.; GRUBER, A.; ZINGALES, B. et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 92, n. 8, p. 3541-3545, 1995.

DA SILVA AC, ESPINOZA AG, TAIBI A, OUAISSI A, MINOPRIO P. A 24,000 MW *Trypanosoma cruzi* antigen is a B-cell activator. **Immunology.**, Oxford, v.94(2), p.189-96, 1998.

DE TITTO, E. H., J. R. CATTERALL, AND J. S. REMINGTON. Activity of recombinant tumor necrosis factor on *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, Baltimore, v.137, p.1342-1346, 1986.

DI NOIA JM, BUSCAGLIA CA, DE MARCHI CR, ALMEIDA IC, FRASCH AC. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. **J Exp Med.**, v.195(4), p.401-13, 2002.

DO PRADO JC JR, LEVY AM, LEAL MP, BERNARD E, KLOETZEL JK. Influence of male gonadal hormones on the parasitemia and humoral response of male *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res.** Berlin, v.85(10), p.826-9, 1999.

DORNER BG, SCHEFFOLD A, ROLPH MS, HUSER MB, KAUFMANN SH, RADBRUCH A, FLESCH IE, KROCZEK RA. MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Washington, v.99(9), p.6181-6. 2002

DOST CK, ALBUQUERQUE S, HEMLEBEN V, ENGELS W, PRADO JC JR. Molecular genetic characterization of different *Trypanosoma cruzi* strains and comparison of their development in *Mus musculus* and *Calomys callosus*. **Parasitol Res.** Berlin, v.88(7), p.609-16, 2002.

DUTHIE, M.S.; WLEKLINSKI-LEE, M.; SMITH, S.; NAKAYAMA, T.; TANIGUCHI, M.; KAHN, S.J. During *Trypanosoma cruzi* infection CD1d-restricted NK T cells limit parasitemia and augment the antibody response to a glycosphosphoinositol-modified surface protein. **Infect. Immun.**, v.70, n.1, p.36-48, 2002.

DVORAK JA. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. **Cell Biochem.** V.24(4), p.357-71, 1984.

EARLAM, R. J. Gastrointestinal aspects of Chagas' disease. **Am. J. Dig. Dis.**, v. 17, n. 6, p. 559-571, 1972.

FERNANDES O, SOUTO RP, CASTRO JA, PEREIRA JB, FERNANDES NC, JUNQUEIRA AC, NAIFF RD, BARRETT TV, DEGRAVE W, ZINGALES B, CAMPBELL DA, COURA JR. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. **Am J Trop Med Hyg.**, Northbrook, v.58(6), p.807-11, 1998.

FERREIRA MS, BORGES AS. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v.97(4), p.443-57, 2002.

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.**, Bethesda, v. 72, p. 359-363, 2004.

FORD-HUTCHINSON, A. W.; BRAY, M. A.; DOIG, M. V.; SHIPLEY, M. E.; SMITH, M. J. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. **Nature**, v. 286, n. 5770, p. 264-265, 1980.

FROSCH S, KRAUS S, FLEISCHER B. *Trypanosoma cruzi* is a potent inducer of interleukin-12 production in macrophages. **Med Microbiol Immunol.**, Berlin, V.185(3), p.189-93. 1996.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, Washington, v. 294, p. 1871-1875, 2001.

GAHMBERG, C. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. **Curr. Opin. Cell Biol.**, Philadelphia, v. 9, p. 643-650, 1997.

GALVAO DA SILVA, A. P.; DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN, I. Interleukin-12 stimulation of lymphoproliferative responses in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology.**, v. 104, n. 3, p. 349-354, 2001.

GALVAO DA SILVA, A. P.; JACYSYN, J. F.; DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN, I. Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T helper type 2 response. **Immunology.**, v. 108, n. 2, p. 230-237, 2003.

GAO, W.; PEREIRA, M. A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Parasitol.**, v. 32, n. 2, p. 167-170, 2002.

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

GILLIAM, M. B.; SHERMAN, N. P.; GRISCAVAGE, J. M.; IGNARRO, L. J. A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by *Aspergillus* nitrate reductase. **Anal. Biochem.**, v. 212, n. 2, p. 359-365, 1993.

GONI, O.; ALCAIDE, P.; FRESNO, M. Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells. **Int. Immunol.**, v. 14, n. 10, p. 1125-1134, 2002.

GOODARZI, K.; GOODARZI, M.; TAGER, A. M.; LUSTER, A. D.; VON ANDRIAN, U. H. Leukotriene B₄ and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues. **Nat. Immunol.**, v. 4, n. 10, p. 965-973, 2003.

GUHL, F.; JARAMILLO, C.; CARRANZA, J. C.; VALLEJO, G. A. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. **Arch. Med. Res.**, v. 33, n. 4, p. 362-370, 2002.

HAREL-BELLAN, A.; JOSKOWICZ, M.; FRADELIZI, D.; EISEN, H. Modification of T-cell proliferation and interleukin 2 production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 80, n. 11, p. 3466-3469, 1983.

HARIZI, H.; GUALDE, N. 5-Lipoxygenase pathway, dendritic cells, and adaptative immunity. **J. Biomed. Biotechnol.**, Ohio, v. 2004, p. 99-105, 2004.

HARIZI, H.; JUZAN, M.; MOREAU, J. F.; GUALDE, N. Prostaglandins inhibit 5-lipoxygenase-activating protein expression and leukotriene B₄ production from dendritic cells via an IL-10-dependent mechanism. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 170, p. 139-146, 2003.

HATCHER FM, KUHN RE, CERRONE MC, BURTON RC. Increased natural killer cell activity in experimental American trypanosomiasis. **J Immunol.**, Baltimore, v.127(3), p.1126-30, 1981.

HAUSCHKA TS, GOODWIN MB. Immunological relationship between seven strains of *Trypanosoma cruzi* and its application in the diagnosis of Chagas' disease. **Am J Trop Med Hyg.**, Northbrook, v.30(1), p.1-16, 1950.

HAUSCHKA TS. Persistence of strain-specific behavior in two strains of *Trypanosoma cruzi* after prolonged transfer through inbred mice. **J Parasitol.**, Lawrence, v.35(6), p.593-9, 1949.

HERWALDT BL. Leishmaniasis. **Lancet.**, London, v.354(9185), p.1191-9, 1999.

HIGUCHI, M. L.; BENVENUTI, L. A.; REIS, M. M.; METZGER, M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovasc. Res.**, London, v. 60, p. 96-107, 2003.

HOFF, R. Killing in vitro of *Trypanosoma cruzi* by macrophages from mice immunized with *T. cruzi* or BCG, and absence of cross-immunity on challenge in vivo. **J. Exp. Med.** v.142, n.2, p.299-311, 1975.

HOFT DF, EICKHOFF CS. Type 1 immunity provides optimal protection against both mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* challenges. **Infect Immun.**, Washington , v.70(12), p.6715-25, 2002.

HOFT DF, SCHNAPP AR, EICKHOFF CS, ROODMAN ST. Involvement of CD4(+) Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi* . **Infect Immun.**, Washington, v.68(1), p.197-204, 2000.

HOLSCHER C, KOHLER G, MULLER U, MOSSMANN H, SCHAUB GA, BROMBACHER F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infect Immun.**, Washington, v.66(3), p.1208-15, 1998.

HUNTER CA, ELLIS-NEYES LA, SLIFER T, KANALY S, GRUNIG G, FORT M, RENNICK D, ARAUJO FG. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.**, Baltimore, v.158(7), p.3311-6, 1997.

HUNTER, C. A.; SLIFER, T.; ARAUJO, F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 7, p. 2381-2386, 1996.

JACOBS F, CHAUSSABEL D, TRUYENS C, LECLERQ V, CARLIER Y, GOLDMAN M, VRAY B. IL-10 up-regulates nitric oxide (NO) synthesis by lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages: improved control of *Trypanosoma cruzi* infection. **Clin Exp Immunol.**, Oxford, v.113(1), p.59-64, 1998.

JAMES SL, KIPNIS TL, SHER A, HOFF R. Enhanced resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice treated with an interferon inducer. **Infect Immun.**, Washington, V.35(2), p.588-93, 1982.

JAMRA MA, DE FREITAS JL, AMATO NETO V, DA SILVA LH, TARTARI JT. Hematological aspects of the initial phases of Chagas' disease. **Rev Paul Med.**, São Paulo, v.45(6), p.544-52, 1954.

KIERSZENBAUM F, HAYES MM. Evaluation of lymphocyte responsiveness to polyclonal activators during acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Trop Med Hyg.**, Northbrook, v.29(4), p.708-10, 1980.

KIERSZENBAUM F, LOPEZ HM, SZTEIN MB. Inhibition of *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses by a protein produced by *T. cruzi* in the course of Chagas' disease. **Immunology.**, Oxford, v.81(3), p.462-7, 1994.

KIERSZENBAUM F, PIENKOWSKI MM. Thymus-dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun.**, Washington, v.24(1), p.117-20, 1979.

KIERSZENBAUM F. Enhancement of resistance and suppression of immunization against experimental *Trypanosoma cruzi* infection by *Corynebacterium parvum*. **Infect Immun.**, Washington, v.12(5), p.1227-9, 1975.

KIERSZENBAUM, F.; HOWARD, J. G. Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. **J. Immunol.**, v. 116, n. 5, p. 1208-1211, 1976.

KIERSZENBAUM, F.; KNECHT, E.; BUDZKO, D.B.; PIZZIMENTI, M.C. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** v.112, n.5, p.1839-1844, 1974.

KJAERGAARD, S. K.; RASMUSSEN, T. R. Clinical studies of effects of nitrogen oxides in healthy and asthmatic subjects. **Cent. Eur. J. Public Health.**, v. 4, p. 23-26, 1996.

KOBAYASHI M, FITZ L, RYAN M, HEWICK RM, CLARK SC, CHAN S, LOUDON R, SHERMAN F, PERUSSIA B, TRINCHIERI G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **J Exp Med.**, New York, v.170(3), p.827-45. 1989.

KÖEBERLE, F. Chagas disease and Chagas syndromes: the pathology of American Trypanosomiasis. **Adv. Parasitol.**, London, v. 6, p. 63-116, 1968.

KOGA R, HAMANO S, KUWATA H, ATARASHI K, OGAWA M, HISAEDA H, YAMAMOTO M, AKIRA S, HIMENO K, MATSUMOTO M, TAKEDA K. TLR-dependent induction of IFN-beta mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.**, Baltimore, v.177(10), p.7059-66, 2006.

KUMAR S, TARLETON RL. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J Immunol.**, Baltimore, v.166(7), p.4596-603, 2001.

LANGE T, DIMITROV S, FEHM HL, BORN J. Sleep-like concentrations of growth hormone and cortisol modulate type1 and type2 in-vitro cytokine production in human T cells. **Int. Immunopharmacol.**, v. 6, n. 2, p. 216-225, 2006.

LAPOINTE MC, SITKINS JR. Phospholipase A2 metabolites regulate inducible nitric oxide synthase in myocytes. **Hypertension.**, Dallas, v.31(1), p.218-24. 1998.

LEWIS, R. A.; AUSTEN, K. F.; SOBERMAN, R. J. Leukotrienes and other products of 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 323, p. 645-655, 1990.

LIEKE T, GRAEFE SE, KLAUENBERG U, FLEISCHER B, JACOBS T. NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. **Infect Immun.** Washington, v.72(12), p.6817-25. 2004.

LIMA, E.S.; ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G. NF- α is expressed at sites of parasite and tissue destruction in the spleen of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Exp. Pathol.** v.82, n.6, p.327-336, 2001.

LIU, C.H.; FAN, Y.T.; DIAS, A.; ESPER, L.; CORN, R.A.; BAFICA, A.; MACHADO, F.S.; ALIBERTI, J. Cutting Edge: Dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. **J. Immunol.** v.177, n.1, p.31-35, 2006

LOCKSLEY RM, HEINZEL FP, SADICK MD, HOLADAY BJ, GARDNER KD JR. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. **Ann Inst Pasteur Immunol.**, Amsterdam, v.138(5), p.744-9, 1987.

LOPES MF, NUNES MP, HENRIQUES-PONS A, GIESE N, MORSE HC 3RD, DAVIDSON WF, ARAUJO-JORGE TC, DOSREIS GA. Increased susceptibility of Fas ligand-deficient gld mice to *Trypanosoma cruzi* infection due to a Th2-biased host immune response. **Eur J Immunol.**, Weinheim, v.29(1), p.81-9, 1999.

LOPES, E. R.; ROCHA, A. et al. Prevalência de megas em necropsias realizadas no Triângulo Mineiro no período de 1954 a 1988. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 211-215, 1989.

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; LOURENÇO, E. V.; ANIBAL, F. F.; et al. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. **J. Immunol.**, v. 175, n. 6, p. 3892-3899, 2005.

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

MALDONADO, I. R.; FERREIRA, M. L.; CAMARGOS, E. R.; CHIARI, E.; MACHADO, C. R. Skeletal muscle regeneration and *Trypanosoma cruzi*-induced myositis in rats. **Histol. Histopathol.**, v. 19, n. 1, p. 85-93, 2004.

MARCIPAR IS, WELCHEN E, ROODVELDT C, MARCIPAR AJ, SILBER AM. Purification of the 67-kDa lectin-like glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*, LLGP-67, and its evaluation as a relevant antigen for the diagnosis of human infection. **FEMS Microbiol Lett.**, v.220(1), p.149-54, 2003.

MARCONDES MC, BORELLI P, YOSHIDA N, RUSSO M. Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. **Microbes Infect.**, Paris, v.2(4), p.347-52, 2000.

MARINHO, C.R.; D'IMPERIO LIMA, M.R.; GRISOTTO, M.G.; ALVAREZ, J.M. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. **Infect. Immun.**, v.67, n.1, p.308-318, 1999.

MARTIN DL, TARLETON RL. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol.** v.174(3), p.1594-601, 2005.

MATZINGER P. Tolerance, danger, and the extended family., **Annu Rev Immunol.**, Palo Alto, v..12, p.991-1045, 1994.

MEDEIROS, A. I.; SA-NUNES, A.; SOARES, E. G.; PERES, C. M.; SILVA, C. L.; FACCIOLI, L. H. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 3, p. 1637-1644, 2004.

MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, JANEWAY CA JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature.**, Basingstoke, v.388(6640), p.394-7, 1997.

MELO RC, BRENER Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J Parasitol.**, v.64(3), p.475-82, 1978.

MICHAILEWSKY, V.; CELES, M. R.; MARINO, A. P.; SILVA, A. A.; VIEIRA, L. Q.; ROSSI, M. A.; GAZZINELLI, R. T.; LANNES-VIEIRA, J.; SILVA, J. S. Intercellular adhesion molecule 1 deficiency leads to impaired recruitment of T lymphocytes and enhanced host susceptibility to infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 173, p. 463-70, 2004.

MICHAILEWSKY, V.; SILVA, N. M.; ROCHA, C. D.; VIEIRA, L. Q.; LANNES-VIEIRA, J.; GAZZINELLI, R. T. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am. J. Pathol.**, v. 159, n. 5, p. 1723-1733, 2001.

MICHELIN, M. A.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. C. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp. Parasitol.**, v. 111, n. 2, p. 71-79, 2005.

MILLER MJ, WRIGHTSMAN RA, STRYKER GA, MANNING JE. Protection of mice against *Trypanosoma cruzi* by immunization with paraflagellar rod proteins requires T cell, but not B cell, function. **J Immunol.** Baltimore v.158(11), p.5330-7. 1997.

MINOPRIO P, BANDEIRA A, PEREIRA P, MOTA SANTOS T, COUTINHO A. Preferential expansion of Ly-1 B and CD4- CD8- T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. **Int Immunol.**, Oxford, v.1(2), p.176-84, 1989a.

MINOPRIO P, EISEN H, JOSKOWICZ M, PEREIRA P, COUTINHO A. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. **J Immunol.**, Baltimore, v.139(2), p.545-50. 1987.

MINOPRIO P, EL CHEIKH MC, MURPHY E, HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M, COFFMAN R, COUTINHO A, O'GARRA A. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. **J Immunol.**, Baltimore, v.151(8), p.4200-8, 1993.

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

MINOPRIO PM, COUTINHO A, JOSKOWICZ M, D'IMPERIO LIMA MR, EISEN H. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. **Scand J Immunol.** V.24(6), p.669-79, 1986b.

MINOPRIO PM, EISEN H, FORNI L, D'IMPERIO LIMA MR, JOSKOWICZ M, COUTINHO A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. **Scand J Immunol.** V.24(6), p.661-8, 1986a.

MINOPRIO, P. M.; EISEN, H.; FORNI, L.; D'IMPERIO LIMA, M. R. et al. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. **Scand. J. Immunol.**, v. 24, n. 6, p. 661-668, 1986.

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

MONTES CL, ACOSTA-RODRIGUEZ EV, MUCCI J, ZUNIGA EI, CAMPETELLA O, GRUPPI A. A *Trypanosoma cruzi* antigen signals CD11b+ cells to secrete cytokines that promote polyclonal B cell proliferation and differentiation into antibody-secreting cells. **Eur J Immunol.**, v.36(6), p.1474-85, 2006.

MONTES CL, VOTTERO-CIMA E, GRUPPI A. Trypanosoma cruzi cytosolic alkaline antigens (FI) induce polyclonal activation in murine normal B cells. **Scand J Immunol.** V.44(2), p.93-100, 1996.

MONTES CL, ZUNIGA E, MINOPRIO P, VOTTERO-CIMA E, GRUPPI A. A Trypanosoma cruzi alkaline antigen induces polyclonal B-cell activation of normal murine spleen cells by T-cell-independent, BCR-directed stimulation. **Scand J Immunol.** v.50(2), p.159-66, 1999.

MOON, C.; AHN, M.; JEE, Y.; HEO, S.; KIM, S.; KIM, H.; SIM, K.; KOH, C.; et al. Sodium salicylate-induced amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in lewis rats is associated with the suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase. **Neurosci. Lett.**, v. 356, p. 123-126, 2004.

MORDUE, D.G.; SIBLEY, L.D. A novel population of Gr-1+-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. **J. Leukoc. Biol.** v.74, n.6, p.1015-1025, 2003.

MOREL C, CHIARI E, CAMARGO EP, MATTEI DM, ROMANHA AJ, SIMPSON L. Strains and clones of Trypanosoma cruzi can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.77(11), p.6810-4, 1980.

MORITA, H.; TAKEDA, K.; YAGITA, H.; OKUMURA, K. Immunosuppressive effect of leukotriene B(4) receptor antagonist in vitro. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 264, n. 2, p. 321-326, 1999.

MUÑOZ-FERNANDEZ, M. A., M. A. FERNANDEZ, AND M. FRESNO.. Synergism between tumor necrosis factor and interferon- γ 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.

NAGINENI CN, PARDHASARADHI K, MARTINS MC, DETRICK B, HOOKS JJ. Mechanisms of interferon-induced inhibition of Toxoplasma gondii replication in human retinal pigment epithelial cells. **Infect Immun.**, v.64(10), p.4188-96, 1996.

NAKANO, H.; YANAGITA, M.; GUNN, M. D. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 194, n. 8, p. 1171-1178, 2001.

NASCIMENTO, F. R. F., CALICH, V. L. G., RODRÍGUEZ D., RUSSO M. Dual Role for Nitric Oxide in Paracoccidioidomycosis: Essential for Resistance, but Overproduction Associated with Susceptibility. **J. Immunol.**, v. 168, p. 4593-4600, 2002.

NASSAR, G. M.; MONTERO, A.; FUKUNAGA, M.; BADR, K. F. Contrasting effects of proinflammatory and T-helper lymphocyte subset-2 cytokines on the 5-lipoxygenase pathway in monocytes. **Kidney Int.**, New York, v. 51, p. 1520-1528, 1997.

Neal RA, McHardy N. Comparison of infectivity of *Trypanosoma cruzi* blood stream trypomastigotes and metacyclic trypomastigotes from *Rhodnius prolixus*. **Acta Trop.** v.34(1), p.79-85, 1977.

NICKELL SP, KEANE M, SO M. Further characterization of protective *Trypanosoma cruzi*-specific CD4⁺ T-cell clones: T helper type 1-like phenotype and reactivity with shed trypomastigote antigens. **Infect Immun.**, Washington, v.61(8), p.3250-8, 1993.

NOGUEIRA N. Host and parasite factors affecting the invasion of mononuclear phagocytes by *Trypanosoma cruzi*. **Ciba Found Symp.**, Amsterdam, v.99, p.52-73, 1983.

NOGUEIRA, N.; GORDON, S.; COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: modification of macrophage function during infection. **J. Exp. Med.**, v.146, n.1, p.157-171, 1977.

NOMIZO A, POSTOL E, DE ALENCAR R, CARDILLO F, MENGEL J. Natural killer T cells are required for the development of a superantigen-driven T helper type 2 immune response in mice. **Immunology**, Oxford, v.116(2), p.233-44, 2005.

NOMIZO, A.; CARDILLO, F.; POSTOL, E.; DE CARVALHO, L. P.; MENGEL, J. V γ 1 $\gamma\delta$ T cells regulate type 1/type 2 immune responses and participate in the resistance to infection and development of heart inflammation in *Trypanosoma cruzi*-infected BALB/c mice. **Microbes Infect.**, v. 8, n. 3, p. 880-888, 2006.

OHSHIMA, S.; SAEKI, Y.; MIMA, T.; SASAI, M.; et al. Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 95, p. 8222-8226, 1998.

ORTIZ-ORTIZ L, PARKS DE, RODRIGUEZ M, WEIGLE WO. Polyclonal B lymphocyte activation during Trypanosoma cruzi infection. **J Immunol.**, Baltimore, v.124(1), p.121-6, 1980.

OTT, V. L.; CAMBIER, J. C.; KAPPLER, J.; MARRACK, P.; SWANSON, B. J. Mast cell-dependent migration of effector CD8⁺ T cells through production of leukotriene B₄. **Nat. Immunol.**, v. 4, n. 10, p. 974-981, 2003.

PADILLA A, XU D, MARTIN D, TARLETON R. Limited role for CD4⁺ T-cell help in the initial priming of Trypanosoma cruzi-specific CD8⁺ T cells. **Infect Immun.**, Washington, v.75(1), p.231-5, 2006

PALACIUS-PRU, E.; CARRASCO, H.; SCORZA, C.; ESPINOZA, R. Ultrastructural characteristics of different stages of human chagasic myocarditis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 41, p. 29-40, 1989.

PENIDO C, VIEIRA-DE-ABREU A, BOZZA MT, CASTRO-FARIA-NETO HC, BOZZA PT. Role of monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine ligand 2 on gamma delta T lymphocyte trafficking during inflammation induced by lipopolysaccharide or Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin. **J Immunol.**, Baltimore, v.171(12), p.6788-94. 2003.

PERES, C. M.; OTTON, R.; CURI, R. Modulation of lymphocyte proliferation by macrophages and macrophages loaded with arachidonic acid. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 23, n. 6, p. 373-381, 2005.

PEREZ BRANDAN C, PADILLA AM, DIOSQUE P, BASOMBRIIO MA. Trypanosoma cruzi: infectivity modulation of a clone after passages through different hosts. **Exp Parasitol.**, Orlando, v.114(2), p.89-93, 2006.

PERLETH M. The discovery of Chagas' disease and the formation of the early Chagas' disease concept. **Hist Philos Life Sci.** v.19(2), p.211-36, 1997.

PINA, A.; SALDIVA, P. H.; RESTREPO, L. E.; CALICH, V. L. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. **J. Leukoc. Biol.**, v. 79, n. 6, p. 1202-1213, 2006.

PINGE-FILHO P, TADOKORO CE, ABRAHAMSOHN IA. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Cell Immunol.** Orlando , v.193(1), p.90-8, 1999.

PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. A. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Cell. Immunol.**, New York, v. 193, p. 90-98, 1999.

PLANELLES L, THOMAS MC, MARANON C, MORELL M, LOPEZ MC. Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant or susceptible mice. *Clin Exp Immunol.*, Oxford, v.131(1), p.41-7, 2003.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect. Dis.**, New York, v. 1, p. 92-100, 2001.

QUAISSI, A.; QUAISSI, M. Molecular basis of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* interaction with their host(s): exploitation of immune and defense mechanisms by the parasite leading to persistence and chronicity, features reminiscent of immune system evasion strategies in cancer disease. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v. 53, p. 102-114, 2005.

QURESHI ST, GROS P, MALO D. Host resistance to infection: genetic control of lipopolysaccharide responsiveness by TOLL-like receptor genes. **Trends Genet.**, Amsterdam, v.15(8), p.291-4., 1999.

READY PD, MILES MA. Delimitation of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by numerical taxonomy. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** London; v.4(2), p.238-42, 1980.

REED SG, BROWNELL CE, RUSSO DM, SILVA JS, GRABSTEIN KH, MORRISSEY PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol.**, Baltimore, v.153(7), p.3135-40, 1994.

REED SG. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **J Immunol.** Baltimore V.140(12), p.4342-7. 1988.

REINHARDT RL, HONG S, KANG SJ, WANG ZE, LOCKSLEY RM. Visualization of IL-12/23p40 in vivo reveals immunostimulatory dendritic cell migrants that promote Th1 differentiation. **J Immunol.**, Baltimore, v.177(3), p.1618-27, 2006.

REQUENA JM, LOPEZ MC, JIMENEZ-RUIZ A, DE LA TORRE JC, ALONSO C. A head-to-tail tandem organization of hsp70 genes in *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Res.**, London, v.16(4), p.1393-406, 1988.

RILEY, E. M.; WAHL, S.; PERKINS, D. J.; SCHOFIELD, L. Regulating immunity to malaria. **Parasite Immunol.**, v. 28, n. 1-2, p. 35-49, 2006.

RIVERA-VANDERPAS MT, RODRIGUEZ AM, AFCHAIN D, BAZIN H, CAPRON A. *Trypanosoma cruzi*: variation in susceptibility of inbred strains of rats. **Acta Trop.** v.40(1), p.5-10, 1983.

RIZZO, L. V.; CUNHA-NETO, E.; TEIXEIRA, A. R. Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun.**, v. 57, n. 9, p. 2640-2644, 1989.

ROCCA, B.; FITZGERALD, G. A. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. **Int. Immunopharmacol.**, Amsterdam, v. 2, p. 603-630, 2002.

ROCHA, P. N., PLUMB, T. J.; COFFMAN, T. M. Eicosanoids: lipid mediators of inflammation in transplantation. **Springer Semin Immunopathol.**, Berlin, v. 25, p. 215-227, 2003.

ROGER T, MICONNET I, SCHIESSER AL, KAI H, MIYAKE K, CALANDRA T. Critical role for Ets, AP-1 and GATA-like transcription factors in regulating mouse Toll-like receptor 4 (Tlr4) gene expression. **Biochem J.**, London, v.387(2), p.355-65, 2005.

ROTTENBERG ME, RODRIGUEZ DA, ORN A. Control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice deprived of T-cell help. **Scand J Immunol.** Oxford v.36(2), p.261-8, 1992.

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

ROTTENBERG, M.; LINDQVIST, C.; KOMAN, A.; SEGURA, E. L.; ORN, A. Modulation of both interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 production during experimental murine *Trypanosoma cruzi* infection. **Scand. J. Immunol.**, v. 30, n. 1, p. 65-72, 1989.

ROWLAND EC, KUHN RE. Suppression of cellular responses in mice during *Trypanosoma cruzi* infections. **Infect Immun.** Washington, v.20(2), p.393-7, 1978.

RUSO M, STAROBINAS N, MINOPRIO P, COUTINHO A, HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi*-infected mice after inactivation of helper T cells. **Ann. Inst. Pasteur Immunol.** V.139, n.3, p.225-236, 1988.

RUSO, M.; STAROBINAS, N.; MARCONDES, M. C.; 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.

SAKAI T, HISAEDA H, ISHIKAWA H, MAEKAWA Y, ZHANG M, NAKAO Y, TAKEUCHI T, MATSUMOTO K, GOOD RA, HIMENO K. Expression and role of heat-shock protein 65 (HSP65) in macrophages during *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of HSP65 in prevention of apoptosis of macrophages. **Microbes Infect.** v.1(6), p.419-27, 1999.

SAVINO W, LEITE-DE-MORAES MC, HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M, DARDENNE M. Studies on the thymus in Chagas' disease. I. Changes in the thymic microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Eur J Immunol.**, Weinheim, v.19(9), p.1727-33, 1989.

SAYLES, P. C.; JOHNSON, L. L. Exacerbation of toxoplasmosis in neutrophil-depleted mice. **Nat. Immun.**, v. 15, n. 5, p. 249-258, 1996.

SCHAEFER L, BABELOVA A, KISS E, HAUSSEER HJ, BALIOVA M, KRZYZANKOVA M, MARSCHE G, YOUNG MF, MIHALIK D, GOTTE M, MALLE E, SCHAEFER RM, GRONE HJ. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. **J Clin Invest.**, Ann Arbor, v.115(8), p.2223-33, 2005.

SCHMUNIS, G.A.; VATTUONE, H.; SZARFMAN, A.; PESCE, U.J. Cell mediated immunity in mice inoculated with epimastigotes or trypomastigotes or *Trypanosoma cruzi*. **Z. Tropenmed. Parasitol.** v.24, n.1, p.81-85, 1973.

SERHAN, C. N.; PRESCOTT, S. M. The scent of a phagocyte: Advances on leukotriene b(4) receptors. **J. Exp. Med.**, v. 192, n. 3, p. F5-F8, 2000.

SILVA JS, ALIBERTI JC, MARTINS GA, SOUZA MA, SOUTO JT, PADUA MA. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz J Med Biol Res.**, Sao Paulo, v.31(1), p.111-5, 1998.

SILVA, J. S. Interleukin 10 and interferon- γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.**, v. 175, p. 169-174, 1992.

SILVA, J., G. VESPA, M. CARDOSO, J. ALIBERTI, AND F. CUNHA.. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma-interferon-activated macrophages. **Infect. Immun.** v.63, p.4862-4867, 1995.

SPANBROEK, R.; HILDNER, M.; STEINHILBER, D.; et al. 5-Lipoxygenase expression in dendritic cells generated from CD34⁺ hematopoietic progenitors and lymphoid organs. **Blood**, New York, v. 96, p. 3857-3865, 2000.

SPINELLA S, LIEGEARD P, GUILBERT B, HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M. Anti-Ia treatment modulates specific and polyclonal antibody responses in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **J Autoimmun.**, London, v.2(6), p.791-802, 1989.

STAROBINAS, N.; RUSSO, M.; MINOPRIO, P.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Is TNF alpha involved in early susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected C3H/He mice? **Res. Immunol.**, v. 142, n. 2, p. 117-122, 1991.

STEINMAN RM, NOGUEIRA N, WITMER MD, TYDINGS JD, MELLMAN IS. Lymphokine enhances the expression and synthesis of Ia antigens on cultured mouse peritoneal macrophages. **J Exp Med.**, New York, v.152(5), p.1248-61, 1980.

SUNDERKOTTER, C.; KUNZ, M.; STEINBRINK, K.; MEINARDUS-HAGER, G.; GOEBELER, M.; BILDAU, H.; SORG, C. Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages in vitro and in vivo. **J. Immunol.** v.151, n.9, p.4891-4901, 1993.

TADOKORO CE, DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN I. Bone marrow-derived macrophages grown in GM-CSF or M-CSF differ in their ability to produce IL-12 and to induce IFN-gamma production after stimulation with *Trypanosoma cruzi* antigens. **Immunol Lett.** Amsterdam v.77(1), p.31-8. 2001.

TALVANI, A.; MACHADO, F. S.; SANTANA, G.; KLEIN, A.; BARCELOS, L. S.; SILVA, J. S.; TEIXEIRA, M. M. Leukotriene B₄ induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 70, p. 4247-4253, 2002.

TANOWITZ, H. B. Chagas disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 5, p. 400-419, 1992.

TARLETON RL, KOLLER BH, LATOUR A, POSTAN M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, London, v.356(6367), p.338-40, 1992.

TARLETON RL, KUHN RE. Changes in cell populations and immunoglobulin-producing cells in the spleens of mice infected with *Trypanosoma cruzi*: correlations with parasite-specific antibody response. **Cell Immunol.**, Orlando, v.80(2), p.392-404, 1983.

TARLETON RL, SCOTT DW. Initial induction of immunity, followed by suppression of responses to parasite antigens during *Trypanosoma cruzi* infection of mice. **Parasite Immunol.** v.9(5), p.579-89, 1987.

TARLETON, R. L.. Tumour necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease. **Clin. Exp. Immunol.** v.73, p.186-191, 1988.

TARLETON, R. L.; GRUSBY, M. J.; ZHANG, L. Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, v. 165, n. 3, p. 1520-1525, 2000.

TARLETON, R. L.; KUHN, R. E. Measurement of parasite-specific immune responses in vitro: evidence for suppression of the antibody response to *Trypanosoma cruzi*. **Eur. J. Immunol.**, v. 15, n. 8, p. 845-850, 1985.

TARLETON, R. L.; ZHANG, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? **Parasitol. Today.**, v. 15, n. 3, p. 94-99, 1999.

TAUB DD, ORTALDO JR, TURCOVSKI-CORRALES SM, KEY ML, LONGO DL, MURPHY WJ. Beta chemokines costimulate lymphocyte cytolysis, proliferation, and lymphokine production. **J. Leukoc. Biol.**, New York, v.59(1), p.81-9, 1996.

TEIXEIRA, A. R.; SANTOS-BUCH, C. A. The immunology of experimental Chagas' disease. II. Delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* antigens. **Immunology.**, v. 28, n. 3, p. 401-410, 1975b.

TEIXEIRA, A. R.; TEIXEIRA, G.; MACEDO, V.; PRATA, A. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. **J. Clin. Invest.**, v. 62, n. 6, p. 1132-1141, 1978.

TEIXEIRA, A. R.; TEIXEIRA, M. L.; SANTOS-BUCH, C. A. The immunology of experimental Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. **Am. J. Pathol.**, v. 80, n. 1, p. 163-180, 1975a.

TIAN, L. et al. The neuronal glycoprotein telencephalin is a cellular ligand for the CD11a/Cd18 leukocyte integrin. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 158, p. 928-936, 1997.

TORRICO F, HEREMANS H, RIVERA MT, VAN MARCK E, BILLIAU A, CARLIER Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J Immunol.** Baltimore v.146(10), p.3626-32. 1991.

TRUYENS, C., F. TORRICO, A. ANGELO-BARRIOS, R. LUCAS, H. HEREMANS, P. DE BATSELIER, AND Y. CARLIER.. The cachexia associated with *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice is attenuated by anti-TNF- α , but not by anti-IL-6 or anti-IFN- γ antibodies. **Parasite Immunol.** v.17, p.561-568, 1995.

UMEZAWA ES, LUQUETTI AO, LEVITUS G, PONCE C, PONCE E, HENRIQUEZ D, REVOLLO S, ESPINOZA B, SOUSA O, KHAN B, DA SILVEIRA JF. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. **J Clin Microbiol.** Washington, v.42(1), p.449-52, 2004.

UNE C, ANDERSSON J, ORN A. Role of IFN-alpha/beta and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-gamma production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Clin Exp Immunol** Oxford. v.134(2), p.195-201. 2003.

URBINA JA, CONCEPCION JL, RANGEL S, VISBAL G, LIRA R. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. **Mol Biochem Parasitol.** v.125(1-2), p.35-45, 2002.

VENKATESH, J.; PEEVA, E.; XU, X.; DIAMOND, B. Cutting Edge: Hormonal milieu, not antigenic specificity, determines the mature phenotype of autoreactive B cells. **J. Immunol.**, v. 176, n. 6, p. 3311-3314, 2006.

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

VILLALTA, F.; KIERSZENBAUM, F. Role of polymorphonuclear cells in Chagas' disease. I. Uptake and mechanisms of destruction of intracellular (amastigote) forms of *Trypanosoma cruzi* by human neutrophils. **J. Immunol.**, v. 131, n. 3, p. 1504-1510, 1983.

VINCENDEAU P, LESTHELLE S, BERTAZZO A, OKOMO-ASSOUMOU MC, ALLEGRI G, COSTA CV. Importance of L-tryptophan metabolism in trypanosomiasis. **Adv Exp Med Biol.**, New York, v.467, p.525-31, 1999.

WESTON D, PATEL B, VAN VOORHIS WC. Virulence in *Trypanosoma cruzi* infection correlates with the expression of a distinct family of sialidase superfamily genes. **Mol Biochem Parasitol.**, Amsterdam, v.98(1), p.105-16. 1999.

WHO - World Health Organization. Control of Chagas disease. **WHO Technical Report Series**, v. 905, p.109.

WIRTH, J. J.; KIERSZENBAUM, F. Stimulatory effects of leukotriene B₄ on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, v. 134, n. 3, p. 1989-1993, 1985.

ZENG X, MOORE TA, NEWSTEAD MW, HERNANDEZ-ALCOCEBA R, TSAI WC, STANDIFORD TJ. Intrapulmonary expression of macrophage inflammatory protein 1alpha (CCL3) induces neutrophil and NK cell accumulation and stimulates innate immunity in murine bacterial pneumonia. **Infect Immun.**, Washington, v.71(3), p.1306-15, 2003.

ZHANG, L., AND R. TARLETON.. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp. Parasitol.** v.84, p.203-213, 1996.

ZHU X, VENKATAPRASAD N, THANGARAJ HS, HILL M, SINGH M, IVANYI J, VORDERMEIER HM. Functions and specificity of T cells following nucleic acid vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Immunol.**, Baltimore, v.158(12), p.5921-6, 1997.

ZINGALES B, STOLF BS, SOUTO RP, FERNANDES O, BRIONES MR. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v.94 Suppl 1, p.159-64, 1999.

ZUNIGA, E.; ACOSTA-RODRIGUEZ, E.; MERINO, M. C.; MONTES, C.; GRUPPI, A. Depletion of immature B cells during *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of myeloid cells and the cyclooxygenase pathway. **Eur. J. Immunol.**, v. 35, n. 6, p. 1849-1858, 2005.

ZUNIGA, E.; MOTRAN, C.; MONTES, C. L.; DIAZ, F. L.; BOCCO, J. L.; GRUPPI, A. *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide (LPS) arrests their proliferation during acute infection. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 119, n. 3, p. 507-515, 2000.

Anexos

8. ANEXOS

8.1. ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 05.1.592.53.2), intitulado: "Papel dos Leucotrienos Durante a Infecção Experimental de Camundongos com *Trypanossoma cruzi*", de autoria de **Adriana Monte Cassiano Canavaci**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 20.09.05

Ribeirão Preto, 22 de setembro de 2005

Presidente da CEUA
Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

8.2. ANEXO B

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto
Comissão de Biossegurança

Via do Café, S/N - Telefone (016) 3602-4213 - Fax (016) 633-1092
14040-903 - Ribeirão Preto - S.P. - Brasil

Of. CIBio/FCFRP/08-2005

Ribeirão Preto, 24 de agosto de 2005.

Prezado Professor,

A Comissão de Biossegurança da FCFRP/USP, em reunião realizada no dia 22 de agosto de 2005, após analisar o formulário para inclusão do Projeto de Pesquisa intitulado "*Papel dos leucotrienos durante a infecção experimental de camundongos com Trypanossoma cruzi*" sob sua responsabilidade, aprovou-o. Desse modo, autoriza V.S^a a usar o CQB da Faculdade, cujo número é: **CQB 0019/97**.

Informamos que ao final da pesquisa, V.S^a deverá apresentar à Comissão de Biossegurança os resultados finais obtidos, a fim de serem encaminhados à CTNBio.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Suraia Said
Presidente da CIBio/FCFRP-USP

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. AURO NOMIZO

Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
FCFRP-USP