

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL APLICADAS

ANA FLÁVIA OLIVEIRA NOTÁRIO

ANÁLISE DO PERFIL IMUNOLÓGICO E CITOISTOLÓGICO DURANTE A
TRANSMISSÃO VERTICAL DE *Trypanosoma cruzi* EM DIFERENTES ESTÁGIOS
DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL

UBERLÂNDIA
Agosto/ 2015

ANA FLÁVIA OLIVEIRA NOTÁRIO

ANÁLISE DO PERFIL IMUNOLÓGICO E CITOISTOLÓGICO DURANTE A
TRANSMISSÃO VERTICAL DE *Trypanosoma cruzi* EM DIFERENTES ESTÁGIOS
DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

Co-orientador: Profa. Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro

UBERLÂNDIA

Agosto/2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

N899a Notário, Ana Flávia Oliveira, 1991
2015 Análise do perfil imunológico e citohistológico durante a transmissão vertical de *Trypanosoma cruzi* em diferentes estágios da infecção experimental / Ana Flávia Oliveira Notário. - 2015.
54 f. : il.

Orientador: Claudio Vieira da Silva.

Coorientadora: Eloísa Amália Vieira Ferro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 3. Metaloproteínas - Teses. 4. Gravidez - Teses. I. Silva, Claudio Vieira da, 1972-. II. Ferro, Eloísa Amália Vieira. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.3

DEDICATÓRIA

A Deus, pela proteção e pelo dom da vida.

Aos meus pais, Lígia e Newton, vocês são meu maior tesouro.

À minha irmã Fabiana, “Seja legal com seus irmãos. Eles são a melhor ponte com o seu passado e possivelmente quem vai sempre mesmo te apoiar no futuro”.

A todos os familiares, a torcida de vocês foi sempre essencial.

Aos meus amigos, o que seria da vida se não existissem os amigos?

A Mateus, obrigada!

A todos que contribuíram nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que tenho e sou, pela proteção e por sempre guiar meus passos.

À Universidade Federal de Uberlândia, em especial ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Ao prof. Dr. Claudio Vieira da Silva, muito obrigada pelos ensinamentos e por todas as oportunidades durante esses 5 anos de convivência, desde a iniciação científica.

À prof. Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro, obrigada pela co-orientação, foi sem dúvida muito relevante para a concretização desse trabalho.

Aos meus pais por sempre me apoiarem e se esforçarem ao máximo para que eu possa atingir meus objetivos e pelas orações.

Ao meu namorado Mateus, obrigada pelo apoio, pela ajuda e pelos momentos de descontração, obrigada por ser importante pra mim.

À minha irmã Bi e minhas primas Mila, Nanda e Naty, obrigada pelas conversas e pela companhia.

À Tia Silvia e Vovó Lena, obrigada por torcerem sempre por mim para que o melhor aconteça.

Aos amigos do Laboratório de Tripanosomatídeos, a família LATRI, pela convivência, aprendizado e pela ajuda sempre. Em especial aqueles que me ajudaram a concretizar esse trabalho. Brunessa, Flávia, Rosi, Amanda, Marlus, Rebs, Paula, Thaise, Aline, Samuca, Silvis, John, Júlia, Nadjânia, Patrícia, Cassiano, Adelaide, Fabrício, Karine e Ana Clara, muito obrigada pessoas!

Aos amigos da Biomed 3, Diga, Gabi, Heber, Japa, Laís, Rach, Lari, Mitso, Nathane, Tafa e Tamirão, somos a melhor biomed do Brasil.

Aos amigos e colegas de mestrado, pela convivência e trocas de experiência.

Aos velhos amigos, Preta, Nira, Digo e Shake, dizem que amizade é tudo na vida!

À amiga de fé Letícia, pelas conversas.

Ao pessoal do Laboratório de Patologia, Ângela, Lúbia, João, Gabi e Japa, muito obrigada por estarem sempre de portas abertas e dispostos a me ajudar.

Aos técnicos do Centro de Experimentação Animal, Taísa, Junão e Marcelo pela simpatia e pelas contribuições.

Aos técnicos do Laboratório de Histologia, obrigada pelo auxílio.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos que contribuíram para que mais essa etapa fosse cumprida.

*“How do you want to be remembered?
As a sinner or a saint, as a hero or a villain?
Think about the steps you take
How do you want to be remembered?
When they're standing at your grave?
On your tombstone, what is written?
Think about the steps you take”*

(MAGIC!)

RESUMO

Trypanosma cruzi, é o agente causador da doença de Chagas. Essa tripanosomíase tem se tornado um problema de saúde mundial devido a migrações de latinoamericanos à países não endêmico. Na América Latina com o sucesso da implementação do controle da infestação doméstica pelo vetor e de transfusões sanguíneas, a importância da transmissão congênita tem aumentado recentemente. Considerando a cuidadosa regulação do sistema imune durante a gestação, nosso objetivo foi investigar as mudanças causadas pela infecção por *T.cruzi* ao sistema imune na progressão da gestação. Foram utilizadas cepas G e Y de *T.cruzi* para infectar fêmeas BALB/c antes ou depois do acasalamento com machos não infectados. A presença da rolha vaginal foi usada como indicativo de acasalamento. As fêmeas foram eutanasiadas 8 dias depois da confirmação da rolha vaginal. Foram usados três grupos controles, fêmeas apenas infectadas, apenas grávidas e nenhuma das situações. Dois grupos de fêmeas foram infectadas antes do acasalamento e dois grupos 4 dias após a confirmação da rolha vaginal. O útero e o baço foram coletados para análises de imunohistoquímica, qPCR, imunofluorescência e dosagem de citocinas. Nossos resultados mostraram que, apesar do padrão de marcação para MMPs ter sido semelhante entre os grupos, a cepa mais virulenta de *T.cruzi* pode impedir a progressão da gestação quando anterior ao acasalamento; a infecção aumentou de forma sistêmica citocinas como IFN- γ , IL-1 β e IL-4; e os leucócitos no ambiente uterino se apresentaram alterados, respondendo de forma local à alteração sistêmica causada pela infecção. Em conclusão, esse trabalho sugere que a infecção por *T.cruzi* pode prejudicar o desenvolvimento da gestação e a resposta local a uma infecção sistêmica foi capaz de controlar a infecção e permitir a progressão da gestação sob algumas dentre as condições analisadas.

Palavras-chave: Metaloproteinase; Gestação; Sistema imune; *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the causative agent of Chagas disease. This trypanosomiasis has become a global public health problem due to migration of Latin Americans to non-endemic countries. In Latin America with the successful implementation of control domiciliated vector infestation and blood transfusion, the importance of congenital transmission has recently increased. Considering the tight regulation of immune system during gestation, we aimed to investigate the changes in the immune system caused by *T.cruzi* infection in the gestation outcome. *T.cruzi* G and Y strain were used to infect female BALB/c mice before or after mating with non-infected male mice. The presence of vaginal plug was used as indicative of mating. Females were euthanized 8 days after confirmation of vaginal plug. We used three female control groups, only infected, only non-infected and non-pregnant females. Two groups were infected before mating and other two were infected 4 days after confirmation of vaginal plug. The uterus and spleen were collected to immunochemistry, qPCR, immunofluorescence and cytokine analysis. Our results showed that despite the MMP's identification being similarly among groups, *T.cruzi* higher virulent strain can impair gestation outcome prior mating; the infection also increased cytokines like IFN- γ , IL-1 β and IL-4; and leucocytes in uterine environment was altered, responding locally to systemic changes caused by *T.cruzi* infection. In conclusion this work suggests that *T.cruzi* infection can impair gestation outcome and local response to systemic infection was able to control the infection allowing pregnancy development in some conditions.

Keywords: Metalloproteinase, Pregnancy; Immune System; *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Linha do tempo ilustrando a diferença entre os grupos. O grupo Controle I não foi infectado. Todas as fêmeas foram colocadas para acasalar no mesmo período..... 25
- Figura 2: Em (A) uma ilustração da rolha vaginal, apontada pela seta, observada em todas as fêmeas. Em (B) a seta indica um sítio de implantação no útero da fêmea que foi considerada gestante. 31
- Figura 3: Gráfico ilustrativo da porcentagem de fêmeas gestantes e não gestantes. Comparativo entre os grupos infectados e o controle gestante. O período da infecção pareceu influenciar naquelas fêmeas infectadas com a cepa Y mais do que em fêmeas infectadas com a cepa G. 31
- Figura 4: Identificação de MMP2 e MMP9 em tecidos embrionários. Corte de embrião de oito dias no controle I e na cepa Y e de 9 dias na cepa G. Grupos infectados depois da rolha vaginal Todos os grupos expressaram uma quantidade semelhante de MMP2 e de MMP9. No controle I destaque de uma célula trofoblástica expressando MMP2. Aumento de 40x. 33
- Figura 5: Coloração em HE evidenciando células do sistema imune em cortes de embrião Em azul: neutrófilo; verde: macrófago;. Aumento de 4x à esquerda e de 40x à direita. 35
- Figura 6: Coloração em HE evidenciando células do sistema imune em cortes de útero. Em azul: neutrófilo, amarelo: linfócito; preto: plasmócito; verde: macrófago; vermelho: eosinófilo e laranja: área de necrose. Aumento de 4x à esquerda e de 40x à direita..... 36
- Figura 7: Gráficos da dosagem de citocinas em sobrenadante de baço de fêmeas infectadas. (A) Houve aumento de IFN- γ em tecidos de fêmeas infectadas antes da rolha vaginal em ambas as cepas, com aumento maior na cepa Y, quando comparado com o grupo controle I e II. (B) No caso da citocina IL-1 β houve aumento apenas no grupo de fêmeas infectadas com a cepa Y antes da rolha vaginal. (C) A citocina TNF- α não apresentou diferença entre os grupos. (D) A citocina de perfil Th2, IL-4, apresentou aumento significativo no grupo de fêmeas infectadas com a cepa Y antes da rolha vaginal e em fêmeas infectadas com a cepa G depois da rolha vaginal. Diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$ 38
- Figura 8: Pesquisa de parasitos da cepa G em útero e/ou sítio de implantação por qPCR. Houve uma maior quantidade de detecção no controle em relação aos grupos gestantes, e quando foi comparado os tempos de infecção, antes ou depois da rolha. Dados considerados significativos quando $p < 0,05$ 39

Figura 9: Detecção de parasitos da cepa Y em tecido uterino no controle III e em cortes de embrião (fêmeas gestantes) no grupo Y depois. <i>T.cruzi</i> marcado em verde com anti-rabbit Alexaflúor® 488	40
Figura 10. Teste do anticorpo produzido anti- <i>T.cruzi</i> . Em (A), (B) e (C) teste do soro de coelho em cultura de TCT de <i>T.cruzi</i> da cepa G nas diluições de 1:100, 1:500 e 1:1000 respectivamente. Em (D) e (E) testes in vivo em cortes de corações chagásicos. Em (D) o parasito marcado em verde com anti-rabbit Alexa fluor488® e em (E) o mesmo corte em contrate de fase, evidenciando o ninho de amastigotas de <i>T.cruzi</i> . Microscopia Confocal.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Especificações dos anticorpos usados de acordo com as respectivas diluições padronizadas, controles positivos empregados e referência.....	25
Tabela 2: Caracterização qualitativa e semi-quantitativa de processo inflamatório em cortes de embrião e /ou útero. As características foram classificadas de acordo com a intensidade, ausente (-), baixo (+), moderado (++) e intenso (+++).....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABC** – Complexo Avidina-Biotina
- A.r.** – Antes da Rolha Vaginal.
- CBEA** - Centro de Bioterismo e Experimentação Animal
- CEUA** - Comitê de Ética na Utilização de Animais
- CONTROLE I** – Fêmeas apenas gestantes
- CONTROLE II** – Fêmeas apenas infectadas com a cepa G
- CONTROLE III** – Fêmeas apenas infectadas com a cepa Y
- CONTROLE IV** – Fêmeas sem infecção e sem gestação
- °C/s** – Graus Celsius por segundo
- Ct** – *Threshold cycle*
- DAB** - Diaminobenzidina
- DCs** – Células Dendríticas
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- dNTP**– Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- D.r.**- Depois da Rolha Vaginal
- ELISA** – Ensaio de Imunoabsorção por Ligação Enzimática
- EDTA**– Ácido etilenodiaminotetracético
- G antes** – Infectadas com a cepa G antes da rolha vaginal
- G depois** – Infectadas com a cepa G depois da rolha vaginal
- H₂O₂** - Peróxido de hidrogênio
- HE** - Hematoxilina-Eosina
- IFN**- Interferon-
- IL** – Interleucina
- IHC-P** – Imunohistoquímica em cortes parafinados
- IP** – Intraperitoneal
- Min** – Minutos
- mL** - Mililitros
- µl** – Microlitros
- MMP2** - Metaloproteinase 2
- MMP9** – Metaloproteinase 9
- NK** - Células *Natural Killers*
- PBS** - Solução salina tamponada com fosfato

PGN – Tampão fosfato, contendo 0,25% de gelatina e 0,1% de azida sódica

pg/mg – Picogramas por Miligramas

PPD – Parafenilenodiamina

qPCR – PCR quantitativo em tempo real

R² – Coeficiente de correlação simples

s – Segundos

TA- Temperatura Ambiente

TC – Tripomastigotas de Cultura

Th1 – T helper 1

Th2 – T helper 2

TNF - Fator de Necrose Tumoral-

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

Y antes - Infectadas com a cepa Y antes da rolha vaginal

Y depois - Infectadas com a cepa Y depois da rolha vaginal

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Considerações Gerais	17
2.2 Formas de Transmissão	19
2.3 <i>T.cruzi</i> e Gestação	20
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Células	24
4.2 Parasitos.....	24
4.3 Animais.....	24
4.4 Infecção dos Animais	24
4.5 Acasalamento e Detecção de Prenhez	25
4.6 Obtenção dos Tecidos para Análise.....	25
4.7 Armazenamento das Amostras	26
4.8 Dosagem de Citocinas por ELISA	26
4.9 Análise Morfológica	26
4.10 Ensaio Imunohistoquímico	26
4.11 Produção de Anticorpo Anti- <i>T.cruzi</i>	28
4.13 Extração de DNA.....	29
4.14 qPCR.....	29
4.15 Análise Estatística	30
5. RESULTADOS.....	31
5.1 Sítios de implantação e desenvolvimento gestacional.....	31

5.2	Identificação de MMP2 e MMP9	32
5.3	Análise de infiltrado inflamatório.....	33
5.4	Análise de citocinas	37
5.5	Detecção do parasita.....	38
6.	DISCUSSÃO.....	41
7.	CONCLUSÃO	46
8.	REFERÊNCIAS.....	47
	ANEXO I.....	53
	APÊNDICE I.....	54

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, está no grupo das doenças negligenciadas e se distribui por toda a América do Sul e Central e pelo sul dos Estados Unidos. A fase aguda da doença está comumente associada a sintomas comuns a outras infecções, e a fase crônica da doença é caracterizada por sintomas como megacólon, megaesôfago e o mais comum entre todos a cardiomegalia chagásica crônica.

O ciclo normal do protozoário na natureza inclui a transmissão por meio de um inseto hematófago, popularmente chamado de barbeiro, que durante o repasto sanguíneo em mamíferos, incluindo o homem, elimina as formas infectantes de *T.cruzi*.

Além das formas de transmissão através do inseto, o parasito pode ser transmitido entre indivíduos por transfusão sanguínea ou doação de órgãos, via congênita; por via oral ou até mesmo por acidentes laboratoriais.

Considerando a forma de transmissão congênita, buscamos estudar não só o contexto da infecção como as alterações que o organismo sofre durante a gestação. Dentro dessas alterações avaliamos a resposta imune sistêmica e algumas adaptações locais para tolerar o feto e responder à infecção.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações Gerais

Trypanosoma cruzi, agente causador da doença de Chagas, é um parasito pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e é caracterizado morfológicamente por apresentar três estágios evolutivos distintos: epimastigota, tripomastigota e amastigota (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984).

O ciclo do parasito é denominado heteroxênico, envolvendo um hospedeiro vertebrado (mamíferos de várias espécies, incluindo o homem) e um vetor invertebrado, representado por insetos hemípteros da Família Reduvidae, cujos gêneros de maior relevância são *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (BARRETO, 1979). Durante o repasto sanguíneo em mamíferos infectados com *T.cruzi*, o inseto vetor pode ingerir formas tripomastigotas sanguíneas, que se transformam em epimastigotas no seu estômago, dividindo-se no intestino médio com intensidade até se diferenciarem em tripomastigotas metacíclicos (formas infectivas) no intestino posterior. Ao se alimentar novamente o inseto defeca, eliminando formas infectantes do parasito, que podem penetrar no organismo através de pele lesionada ou mucosas. Na corrente sanguínea do novo hospedeiro, tripomastigotas metacíclicos invadem vários tipos celulares, formando um vacúolo parasitóforo intracelular, onde se diferenciam em amastigotas, forma arredondada e sem flagelo externo, que causam lise do vacuolo. Estas são formas replicativas do parasito que após o rompimento da membrana do vacúolo se multiplicam por divisão binária e diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos após cerca de cinco dias. O parasito é então liberado no interstício, podendo invadir novas células, ou serem ingeridos pelo inseto durante seu repasto sanguíneo (DE SOUZA, 2000; MORTARA et al., 2008; HERNANDEZ OSORIO et al., 2010).

O envolvimento de formas amastigotas na manutenção de infecção ativa foi demonstrada em modelos experimentais. Acredita-se que a presença destas formas, designadas amastigotas intracelulares, no ambiente extracelular possa ser devido à lise prematura das células infectadas, ou decorrentes da diferenciação de tripomastigotas extracelulares, nesse caso são designadas amastigotas extracelulares; tal envolvimento foi descrito em um subciclo alternativo, sendo essas formas capazes de invadir células fagocíticas e não fagocíticas (PAN, 1978; LEY, 1988; MORTARA, 1991; ALVES;

MORTARA, 2009). Essa capacidade invasiva de amastigotas constitui *in vivo* um modo alternativo de propagação do ciclo do parasito, o que contribui para a sobrevivência do mesmo no hospedeiro vertebrado (REGO, 1956; BURLEIGH; ANDREWS, 1995).

As consequências em geral da infecção aguda por *T.cruzi* podem variar desde sintomas mais simples, semelhantes a um resfriado, até miocardites assintomáticas, que afetam a maioria dos indivíduos infectados. Também existem casos mais graves com alto parasitismo tecidual e na corrente sanguínea em cerca de 10 % de indivíduos infectados (CHAGAS, 1909; DIAS et al, 1956). Esse subgrupo pode desenvolver miocardite fulminante, que frequentemente é fatal (ANDRADE, 1999). Por outro lado, a maioria dos indivíduos infectados permanece livre de qualquer sinal clínico, são chamados de pacientes em fase indeterminada, e décadas mais tarde podem desenvolver a forma de cardiomiopatia inflamatória conhecida como Cardiomiopatia Chagásica Crônica. As manifestações na fase crônica também podem levar a quadros de: megaesôfago, megacólon e lesões no sistema nervoso periférico, ocasionando deservação (FREITAS et al, 2005; BILATE et al., 2008).

A patogênese da doença de Chagas relaciona-se a diversos fatores do parasito, hospedeiro e ambiente. Em relação ao parasito, já é bem caracterizada a existência de diversidade genética intraespecífica, demonstrada pelas diferenças biológicas, bioquímicas e moleculares de isolados do parasito (ANDRADE et al., 2002; MACEDO et al., 2004; DUTRA et al., 2008; DUTRA et al., 2009; FREITAS et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010).

Devido à variabilidade genética e biológica de *T.cruzi* e a partir de estudos de polimorfismo genético, esta espécie foi primeiramente agrupada em duas grandes linhagens filogenéticas: *T.cruzi* I, associado com o ciclo silvestre e *T.cruzi* II, ligado à doença humana. E, após um consenso em relação à classificação das cepas, foi definido a divisão da espécie em seis subgrupos (*T.cruzi* I-VI). A cepa G (YOSHIDA, 1983) foi classificada dentro do grupo I, e a cepa CL (BRENER; CHIARI, 1963), que antes pertencia ao grupo II, agora pertence ao grupo VI, grupo que inclui a cepa Y (SOUTO et al., 1996; MACEDO et al., 2004; ZINGALES et al., 2009). Estas cepas apresentam mecanismos diferentes de interação com a célula hospedeira, e, conseqüentemente infectividade diferente (MORTARA et al., 2005; ALVES; MORTARA, 2009).

2.2 Formas de Transmissão

As principais formas de transmissão de *T.cruzi* correspondem à transmissão pelo vetor, transmissão pela transfusão sanguínea, via congênita e via oral. Consideram-se formas alternativas de transmissão as demais vias: transplante de órgãos e acidental. Outras formas são vistas como excepcionais ou hipotéticas, como via sexual, contaminações através de outros vetores e por práticas esdrúxulas, como juras de amor (rituais religiosos que envolvem troca sanguínea entre os parceiros) e uso comunitário de drogas injetáveis (CHIEFFI; AMATO NETO, 2011; DIAS; MACÊDO, 2005).

Com os avanços no controle dos vetores domiciliados e o rigoroso controle em bancos de sangue em toda área endêmica, outras vias de transmissão começaram a ter maior importância. Como as vias de transmissão oral e congênita (DIAS, 2007).

De acordo com o Consenso Brasileiro de Doença de Chagas (CBDC), é considerado caso congênito crianças nascidas de mães infectadas, com a confirmação do parasito no sangue do recém-nascido e/ou a detecção de anticorpos não maternos na criança após os seis ou sete meses de idade, desde que sejam excluídas outras formas de transmissão (CARLIER et, 2002 ; MOYA ; MORETTI, 1997). Os casos de transmissão congênita de *T.cruzi* são em sua maioria assintomáticos e afetam gravemente a sobrevivência do recém-nascido (GÜRTLER ; SEGURA; COHEN, 2003).

O parasito alcança a circulação fetal por via sanguínea, como resultado de inflamação na placenta, onde se encontra focos inflamatórios agudos e/ou crônicos, áreas de necrose, presença de células gigantes e parasitismo das células trofoblásticas e macrófagos. O parasito pode entrar de forma ativa na circulação fetal, não existindo uma correlação direta entre o número de parasitos na placenta e a infecção fetal (PIAT et al, 2009).

Estudos mostram que clinicamente, mais de 70% das crianças com transmissão congênita são normais e assintomáticas. Um número nunca maior que 10% pode apresentar clínica potencialmente grave, com quadro febril, hepatoesplenomegalia, miocardite, meningoencefalite ou prematuridade. Nesses casos, há um elevado risco de morte, devendo ser prontamente diagnosticados e tratados (ALTCHEH, 2011; MOYA ; MORETTI, 1997).

No Brasil o risco de transmissão congênita em gestantes infectadas é de aproximadamente 1%. E essa proporção pode aumentar em outras áreas da América Latina, chegando a 12%. Fenômenos de globalização e migrações internacionais têm contribuído para o surgimento de novos casos de Doença de Chagas em países não endêmicos (SCHMUNIS; YADON, 2010). Na Espanha, aconteceu uma imigração intensa nos últimos dez anos, sendo que entre 1998 e 2010 o número de estrangeiros registrados cresceu quase sete vezes, e aproximadamente 2 milhões dos imigrantes são da América do Sul e Central (Instituto Nacional de Estatística, 2012). Um levantamento feito em 2008 indicava na Espanha mais de 50 mil casos (Instituto Oswaldo Cruz). A migração de mulheres soropositivas para *T.cruzi*, em idade fértil, vindas da América Latina para países desenvolvidos pode disseminar a doença de Chagas em áreas não endêmicas através da transmissão vertical (JACKSON et al, 2009).

Ao mesmo tempo em que a doença de Chagas é considerada uma das parasitoses mais graves das Américas, é também uma das enfermidades mais subestimadas. A infecção diagnosticada ainda na gravidez é facilmente tratada em recém-nascidos, com elevadas taxas de cura, chegando a quase 100%. As drogas utilizadas atualmente Nifurtimox (Lampit®, Bayer) e Benznidazol (Radanil®, Roche) (RASSI et al, 2007) são contraindicados em gestantes, porém toleradas em crianças (PIAT et al, 2009). Contudo, poucos são os serviços de pré- natal que incluem, rotineiramente, sorologia para doença de Chagas em gestantes procedentes ou naturais de áreas endêmicas para esta enfermidade (FRAGATA FILHO et al, 2009)

A falta de detecção precoce dos casos de Chagas congênita leva muitas vezes a evolução dos mesmos a formas crônicas e subsequente diminuição da qualidade de vida que, somada ao custo elevado do tratamento, se torna um problema de saúde pública (PIAT et al, 2009).

2.3 *T.cruzi* e Gestação

O organismo reage à grande variedade de agentes físicos, químicos e biológicos potencialmente lesivos, aos quais os animais são expostos diariamente, para isso conta com o sistema imune, capaz de identificar substâncias “próprias” e “não próprias”, preparando mecanismos de defesa para evitar a ocorrência de doenças. Em algumas situações, este sistema orgânico precisa também tolerar a presença de organismos, que são considerados “não próprios”, para garantir eventos primordiais na manutenção e

perpetuação da vida. A gestação é um exemplo desta situação e para que a reprodução seja viável é fundamental que o organismo materno tolere a presença do feto até que este venha a termo (VASCONCELLOS et al, 2003).

Um paradigma inicial para a forma como ocorre essa resposta imunológica afirma que citocinas de perfil Th1 exercem efeito prejudicial, induzindo a reação inflamatória e a necrose placentária, podendo assim comprometer o desenvolvimento do feto e/ou placenta. Por outro lado, as citocinas Th2 seriam benéficas para a gestação, promovendo proliferação e diferenciação de células trofoblásticas e a placentação, além disso, desempenhando um papel protetor sobre a unidade feto-placentária inibindo a produção de citocinas do tipo Th1. Essa teoria afirma que o sucesso gestacional está associado ao desenvolvimento preferencial de perfil Th2. Sendo um processo cuidadosamente regulado (WEGMANN et al, 1993).

A interação da gestação e sistema inume, tem duas consequências em uma infecção parasitária. Primeiro, a gestação pode favorecer a sobrevivência de muitos parasitas que necessitam de uma resposta tipo Th1 (T helper 1) para serem controlados. Segundo, infecções parasitárias que induzem uma resposta do tipo Th1 exacerbada podem afetar a gestação. A citocina pró-inflamatória IFN- γ tem sido relatada como potencialmente deletéria para a concepção (ROBERTS; WALKER; ALEXANDER, 2001)

A atividade do sistema imune está diretamente relacionada com a presença de células como leucócitos, componentes importantes do útero (decídua e miométrio) normalmente em um quadro gestacional e desempenham múltiplos papéis ao longo da gestação, incluindo: implantação, estabelecimento da unidade fetoplacentária, tolerância materna ao feto semi-alógeno, defesa contra infecções e a indução ao parto (AREK; HECHER, 2013). Mesmo no endométrio de um útero normal os leucócitos têm sido encontrados nas fases proliferativas e no início da fase secretória mensal e seus números aumentam significativamente no momento de uma possível implantação (THIRUCHELVAM et al, 2013).

Além da resposta imunológica, proteínas como metaloproteinases (MMPs), também são importantes para o sucesso gestacional. Durante processos fisiológicos normais, tal como embriogênese e cicatrização de feridas, a atividade de MMPs é cuidadosamente regulada pela combinação da ativação ou inibição de seus ativadores. (BREW;

NAGASE, 2010). Um balanço entre essa ativação e inibição é essencial para evitar atividades descontroladas de MMPs, que podem causar inúmeras patologias, tais como progressão tumoral, doenças vasculares, neurodegenerativas e autoimunes (ROSENBERG et al 2009).

Estudos realizados por Castillo e colaboradores em 2012, mostraram que *T.cruzi* induz aumento tanto na expressão quanto na atividade de MMP-2 e MMP-9, MMPs constitutivamente expressas, em vilosidade coriônica. Além disso, a inibição de MMPs preveniu o dano ao tecido induzido por *T.cruzi* e diminuiu parcialmente a infecção *ex vivo* da vilosidade coriônica, indicando que essas proteínas são parcialmente responsáveis pelas mudanças na matriz extracelular (MEC) observadas em vilosidades coriônicas humanas durante a infecção por *T.cruzi* e que participam na invasão tecidual.

Dados recentes em fêmeas de camundongos Balb/c infectadas com *T.cruzi*, mostraram que a infecção aguda é prejudicial para a progressão da gestação, podendo impedir drasticamente o desenvolvimento embrionário, como abortos espontâneos, e em alguns casos levando a infertilidade (CENCIG et al 2013; NOTÁRIO et al 2013).

Dessa forma, mais estudos são necessários a fim de buscar os mecanismos pelos quais a infecção por *T.cruzi* prejudica o desenvolvimento normal da gestação. A fim de fornecer futuras abordagens terapêuticas e profiláticas, podendo melhorar a qualidade de vida da gestante e do feto, como a prevenção de abortos espontâneos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil imunológico e citohistológico de fêmeas infectadas com cepa G ou Y de *T.cruzi* no antes ou depois do início da gestação.

3.2 Objetivos Específicos

- Acompanhar o desenvolvimento inicial da gestação de fêmeas com infecção experimental pelas cepas G ou Y de *T.cruzi*
- Analisar o perfil de citocinas em tecidos maternos e embrionários.
- Analisar infiltrado inflamatório em tecidos uterinos e/ou embrionários.
- Comparar a capacidade de engravidar e de manter a gestação em diferentes fases de infecção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Células

Células Vero (fibroblastos de rim de macaco verde da África), foram utilizadas para manutenção do ciclo de *T.cruzi in vitro*. Foram cultivadas na presença de meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (DMEM-10% SFB) e mantidas a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂.

4.2 Parasitos

Neste estudo, foram utilizadas as cepas G (YOSHIDA, 1983) e Y (BRENER; CHIARI, 1963) de *T.cruzi*. Os parasitos foram mantidos em células descritas anteriormente, com sucessivos repiques para dar continuidade ao ciclo de *T.cruzi*. Após o rompimento das células, o meio da garrafa de cultura foi retirado e centrifugado. Em um primeiro momento a 1500 rpm por 5 minutos, para a separação dos restos celulares presentes, logo após o *pellet* formado foi descartado e o sobrenadante centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 1 mL de *phosphate buffered saline* (PBS) para posterior contagem em câmara de Neubauer.

4.3 Animais

Camundongos Balb/c foram mantidos em condições padrões de temperatura (25 ± 2 °C) e iluminação (ciclo alternando 12 horas com luz 12 horas em ausência de luz), com alimento e água ad libitum. A manutenção e cuidado dos animais estiveram de acordo com o Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal de Uberlândia. A eutanásia dos animais foi realizada de acordo com os fundamentos internacionais de bem-estar animal, conforme Orientações da Associação Médica Veterinária em Eutanásia (2007). Protocolo CEUA 040/15 (ANEXO I).

4.4 Infecção dos Animais

Camundongos fêmeas de Balb/c de seis a oito semanas de idade foram infectados com 5 x 10⁴ tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) de *T.cruzi* das cepas G ou Y via intraperitoneal (IP).

4.5 Acasalamento e Detecção de Prenhez

Fêmeas virgens de Balb/c foram colocadas nas gaiolas dos machos na proporção de duas fêmeas para cada macho. Após 14 horas, foi verificada a presença da rolha vaginal (mistura de sêmen e secreção vaginal). O dia em que foi observada a presença da rolha vaginal foi considerado o primeiro dia de gestação. As fêmeas divididas em 8 grupos de 6, sendo 4 grupos infectados (Figura 1) e 4 grupos controles. O controle I não foi infectado, as fêmeas foram apenas colocadas para acasalar; as fêmeas do controle II foram infectadas apenas com TCT da cepa G e as fêmeas do controle III com TCT da cepa Y. As fêmeas do controle IV não estavam nem infectadas e nem grávidas. Todas as fêmeas foram sacrificadas no 8º ou 9º dia após a observação da rolha vaginal.

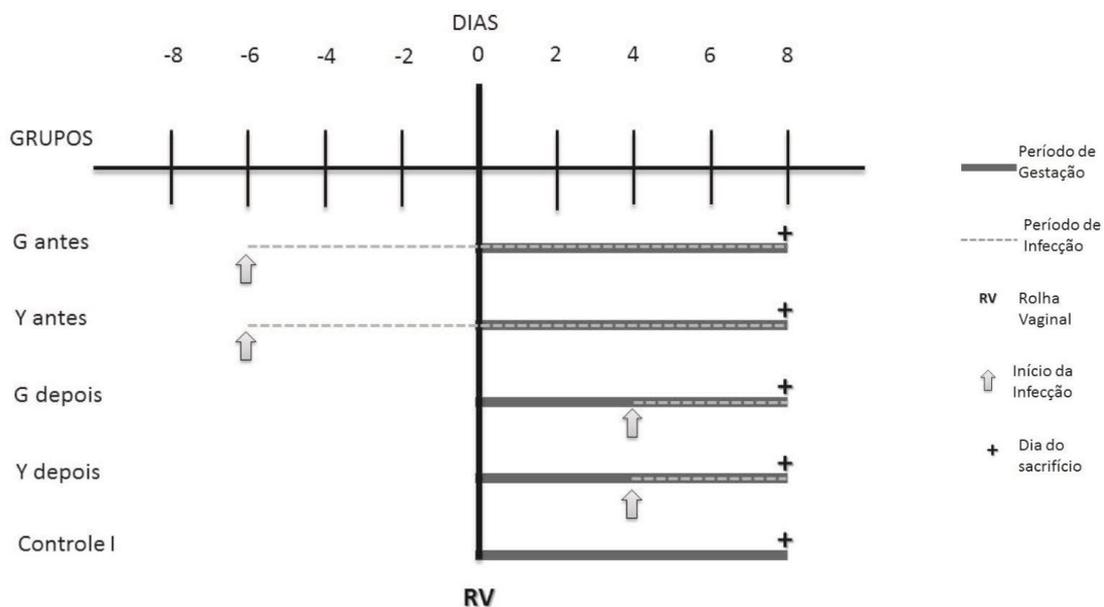


Figura 1: Linha do tempo ilustrando a diferença entre os grupos. O grupo Controle I não foi infectado. Todas as fêmeas foram colocadas para acasalar no mesmo período.

4.6 Obtenção dos Tecidos para Análise

Animais foram anestesiados com 0,2 mL (para cada 100 gramas do animal) de uma solução contendo Cetamina a 37,5 mg/mL e Xylasina a 5 mg/mL em água, e logo após foram eutanasiadas de acordo com as regras do Comitê de Ética local. Logo depois, foi feita uma laparotomia. Foram coletados baço e útero dos animais. Aquelas fêmeas que tinham sítios de implantação foram consideradas fêmeas grávidas e tais sítios foram coletados. Das fêmeas não gestantes foi coletado todo o útero. As amostras de útero/ sítio de implantação foram separadas para posterior processamento histológico e para PCR.

4.7 Armazenamento das Amostras

As amostras de tecido foram armazenadas em Protease Inhibitor Cocktail I[®] com quantidade suficiente para cobrir completamente a amostra. Logo depois de maceradas, as amostras de tecidos foram mantidas em freezer -20°C.

Os órgãos coletados para morfológica e imunohistoquímica foram mantidos em formol 4% durante 24 horas e posteriormente armazenados em álcool 70% até o momento do processamento para inclusão em parafina.

4.8 Dosagem de Citocinas por ELISA

A dosagem de citocinas foi feita em amostras de baços maternos. Foi utilizada a reação de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) indireta. As reações foram feitas de acordo com o protocolo do fabricante do kit BD Biosciences[®]. A leitura foi feita em absorbância de 450 nm. As citocinas dosadas foram: IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , e IL-4.

4.9 Análise Morfológica

Cortes histológicos de 4 μ m foram feitos a partir dos blocos parafinados, no caso dos sítios de implantação foram feitos cortes sequenciais em todo o tecido e a preferência para análise foi para aquelas lâminas que continham corte de embrião. Posteriormente esses cortes passaram por processo de desparafinização e hidratação em concentrações decrescentes de álcool etílico para coloração com Hematoxilina-Eosina (HE). Após a coloração as lâminas foram montadas e analisadas a microscopia óptica nas objetivas de 4x, 10x e 40x. Análise do infiltrado inflamatório foi feita analisando 10 campos aleatórios na objetiva de 40x com o auxílio de um patologista.

4.10 Ensaio Imunohistoquímico

A técnica utilizada para identificação da expressão das proteínas MMP2 e MMP9 foi a estreptavidina-biotina-peroxidase, todos os anticorpos foram adquiridos da empresa Abcam[®]. As diluições consideradas para cada anticorpo, controle positivos, bem como a referência dos mesmos estão detalhados na Tabela 1.

Tabela 1: Especificações dos anticorpos usados de acordo com as respectivas diluições padronizadas, controles positivos empregados e referência.

Anticorpos	Diluição	Controle Positivo	Referência
Anti- MMP2	1:1000	Carcinoma de próstata	ab 86607
Anti- MMP9	1-1500	Linfoma	ab 137867

Para o ensaio imunohistoquímico, cortes teciduais de 4µm de espessura foram obtidos do blocos parafinados montados em lâminas sinalizadas com Poly-L-Lisina®. Os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol. Para a remoção do pigmento formólico os cortes foram imersos em solução de hidróxido de amônio 10% em etanol 95%, por 10 minutos, em seguida as lâminas passaram por 7 lavagens em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada de acordo com a padronização do laboratório e recomendações dos fabricantes, utilizando solução tampão EDTA (pH 8.0) em Decloaking Chamber™ NxGen (Biocare Medical, Concord, CA, USA) com ciclo de 110°C por 15 minutos. Após o resfriamento e lavagem em 5 banhos de água destilada, os cortes foram submetidos primeiramente, ao bloqueio da biotina endógena com solução de clara de ovo, na proporção de 2 claras de ovo para 200ml de água destilada, essa solução é previamente homogeneizada e filtrada e então incubada com as lâminas a TA, por 20 minutos. Em seguida, 10 lavagens em água destilada, para retirar todo o excesso da solução para então bloquear a avidina endógena através do uso de leite em pó desnatado Molico®, na proporção de 30g de leite para 180ml de água destilada, a TA por 20 minutos, seguido de 10 banhos em água destilada novamente. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizada com solução de H₂O₂ a 10%, em 3 banhos de 10 minutos cada, após esse bloqueio os cortes foram lavados em 5 banhos de água destilada. Os cortes foram submetidos a 3 banhos de 5 minutos cada em solução tampão TRIS-HCl (pH 7.4). Depois desses passos os cortes estavam prontos para seguirem as incubações com o kit Starr Trek™ Universal HRP Detection System (Referência: STUHRP700, Biocare Medical, Concord, CA, USA), todas as incubações foram realizadas em câmara úmida a TA, a primeira solução utilizada foi a solução de bloqueio Background Sniper, por 15 minutos em câmara úmida a TA, para bloqueio de ligações inespecíficas, depois desse passo é necessário a retirada do excesso de background das lâminas com auxílio de papel filtro. O próximo passo foi a incubação com os anticorpos primários, o tempo de incubação padronizado para os anticorpos foi de 2 horas a TA.

Após esse período de incubação, os cortes foram lavados em solução de TRIS-HCl, em 2 banhos de 2 minutos cada, e então incubados com a solução Trekkie Universal Link (disponível no kit) contendo anticorpo secundário, a TA por 20 minutos. Os cortes foram novamente lavados em TRIS-HCl, em 2 banhos de 2 minutos cada, e imersos com a solução contendo o complexo terciário TrekAvidin-HRP (disponível no

kit), a TA por 10 minutos, seguido de lavagem em TRIS-HCl, em 2 banhos de 2 minutos cada novamente.

A revelação foi realizada com cromógeno DAB (disponível no kit) por 3 minutos, após esse passo os cortes foram lavados em água corrente e depois contracorados com Hematoxilina de Harris. Os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e finalmente montados. Os controles positivos estão especificados na Tabela 1 e a omissão dos anticorpos primários foi utilizada como controle negativo.

4.11 Produção de Anticorpo Anti- *T.cruzi*

O anticorpo anti- *T.cruzi* foi produzido mediante a imunização de um coelho pesando cerca de 800g. Foram feitas três imunizações com intervalo de sete dias entre as administrações. Sete dias após a última imunização o sangue foi retirado por punção cardíaca. As imunizações foram feitas com 10^7 parasitos da cepa G mortos por alta temperatura (10 minutos a 90 °C) diluídos em PBS 1X e acrescentado o adjuvante na proporção de 1:1. Na primeira imunização foi utilizado o adjuvante de Freund completo e nas duas seguintes o adjuvante incompleto. O anticorpo produzido foi testado *in vitro* e *in vivo* (APÊNDICE I).

4.12 Ensaio de Imunofluorescência

Lâminas contendo cortes histológicos foram submetidas a sucessivos tratamentos para inibir a auto-fluorescência do tecido fixado em formol: iniciou-se o processo de remoção da parafina, com xilol e álcool; seguidos por tratamento com Glicina 3% em PBS 1x por 10 minutos; bloqueio BSA 2,5% em água destilada por 1 hora a 37°C. Procedeu-se a marcação de anticorpo primário anti – *T.cruzi* (soro proveniente de coelhos previamente imunizados), na proporção de 1:500 diluídos em PGN-saponina overnight a 4°C ; e, por fim, marcação do anticorpo secundário anti-*rabbit* Alexa flúor 488 em verde na proporção de 1:200 para marcação do parasito e DAPI na proporção 1:500 diluídos em PGN-saponina para marcação de núcleo. Adicionou-se PPD, lamínulas e estas foram vedadas com esmalte. As imagens foram capturadas em microscópio confocal Carl Zeiss® nas objetivas de 40x e 63x. Como controle positivo foram utilizados cortes de corações sabidamente positivos para *T.cruzi*.

4.13 Extração de DNA

A extração do DNA foi feita utilizando o kit comercial PureLink® Genomic DNA Kit (Invitrogen, catalog number K1820-01), de acordo com as orientações do fabricante. A quantidade e a pureza do DNA extraído foram determinadas por espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis).

4.14 qPCR

As amostras de DNA extraídas foram submetidas à reação de qPCR utilizando-se o *primer* D71: 3'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-5', que amplifica uma região do gene 24s ribossomal de *T. cruzi* TcI (110pb). Para as reações de qPCR, com um volume final de 12,5 µL, foram adicionados 2 µL (~ 50 ng) de DNA. Utilizamos o reagente SYBR® Green PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems), contendo SYBR® Green Dye AmpliTaq Gold® DNA polimerase, dNTPs com dUTP, Rox referência passiva, tampão com componentes otimizados, e 10 µM de *primer* (D71 e D72). As reações foram realizadas na plataforma ABI7300 (Applied Biosystems) com o seguinte programa: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 58°C por 45 seg e 72°C por 30 segundos. Após o alongamento final da PCR, as amostras foram submetidas à variação de temperatura de 50 a 95°C, com um aumento gradual de 0,5 ° C / s para se obter a temperatura de fusão (T_m) e produtos não específicos. Os resultados foram analisados utilizando o programa 7300 System SDS Software vs. 1.4. Todas as extrações de DNA e as reações de amplificação foram realizadas com controles negativos adequados para detectar a contaminação em qualquer fase do processo e com controles positivos que deram resultados reproduzíveis durante todas as experiências. A curva padrão foi preparada a partir de diluição de 1010 cópias de DNA/ µL (1010 a 105) de *T. cruzi* (cepas G)em 1mg/mL de BSA (soro albumina bovina). Para o cálculo das diluições foi utilizada a ferramenta *on line* DNA copy number calculation (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/copynumber/>). Para cada curva padrão, o software SDS 7300 (Applied Biosystems) procurou o melhor ajuste entre os pontos, calculou a regressão linear e forneceu o R², o *slope* (inclinação da curva) e o *y-intercept*. O R² mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de Ct das amostras padrão (um valor de 1 indica uma ajuste perfeito entre a regressão linear e os dados individuais). O *slope* indica a eficiência da amplificação para o ensaio (um valor de 3,32 representa 100% de eficiência), e o *y-intercept* indica o valor esperado de Ct para uma amostra com

quantidade 1. Utilizando-se o slope pode se calcular a eficiência de cada reação, por meio da fórmula: $E = 10 (-1/\text{slope}) - 1$ (APPLIED BIOSYSTEMS, 2012).

4.15 Análise Estatística

A significância dos experimentos foi determinada pelo método one way ANOVA, realizado de acordo com o programa *VassarStats* (©Richard Lowry 1998-2006), através do programa GraphPad Prism, versão 5.01, sendo os resultados considerados significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Sítios de implantação e desenvolvimento gestacional

A rolha vaginal foi vista em todas as fêmeas, contudo consideramos gestantes apenas aquelas fêmeas que possuíam o sítio de implantação no útero no dia em que foram sacrificadas (Figura 2).



Figura 2: Em (A) uma ilustração da rolha vaginal, apontada pela seta, observada em todas as fêmeas. Em (B) a seta indica um sítio de implantação no útero da fêmea que foi considerada gestante.

Houve diferença entre os grupos quando comparadas com as fêmeas do grupo controle. Aquelas fêmeas que foram infectadas com a cepa Y antes do acasalamento não conseguiram ficar gestantes, enquanto 50% das fêmeas infectadas com a cepa G na mesma situação conseguiram engravidar. Quando a infecção ocorreu quatro dias após a rolha vaginal, houve um maior número de fêmeas gestantes em ambas as cepas. Todas as fêmeas do grupo controle estavam gestantes no dia do sacrifício (Figura 3).

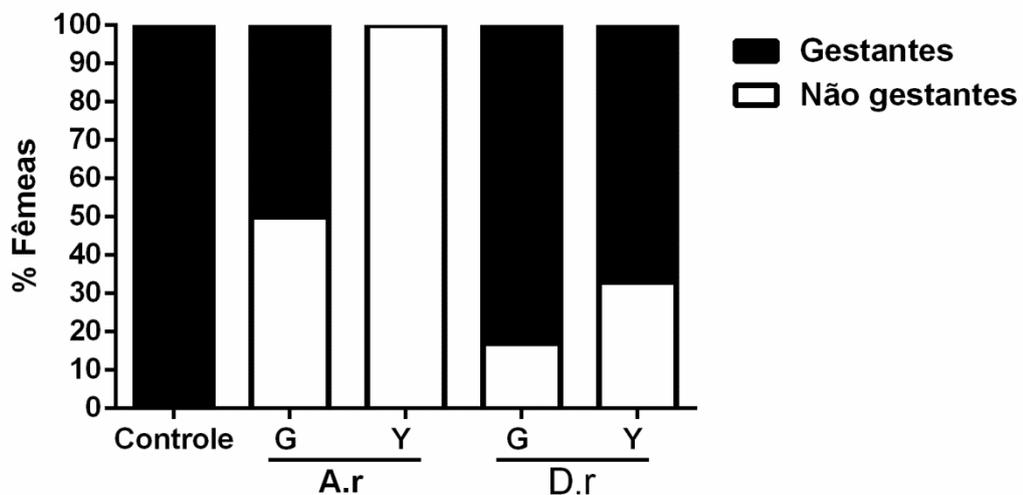


Figura 3: Gráfico ilustrativo da porcentagem de fêmeas gestantes e não gestantes. Comparativo entre os grupos infectados e o controle gestante. O período da infecção pareceu influenciar naquelas fêmeas infectadas com a cepa Y mais do que em fêmeas infectadas com a cepa G.

Para entender a diferença existente entre os grupos em relação à capacidade de engravidar, analisamos alguns fatores que estão envolvidos no sucesso da implantação e desenvolvimento gestacional.

5.2 Identificação de MMP2 e MMP9

A identificação dessas proteínas de matriz foi feita por meio de ensaio imunohistoquímico, analisando cortes histológicos de embriões e de úteros não gestantes. Tais proteínas foram encontradas em útero, infectado ou não, (dados não mostrados) e estiveram expressas em sítio de implantação onde há o embrião. MMP2 e MMP9 foram identificadas principalmente na periferia da região de contato do embrião com a luz uterina (Figura 4). Sendo expressa por células embrionárias (trofoblastos) e por células maternas (células da decídua uterina).

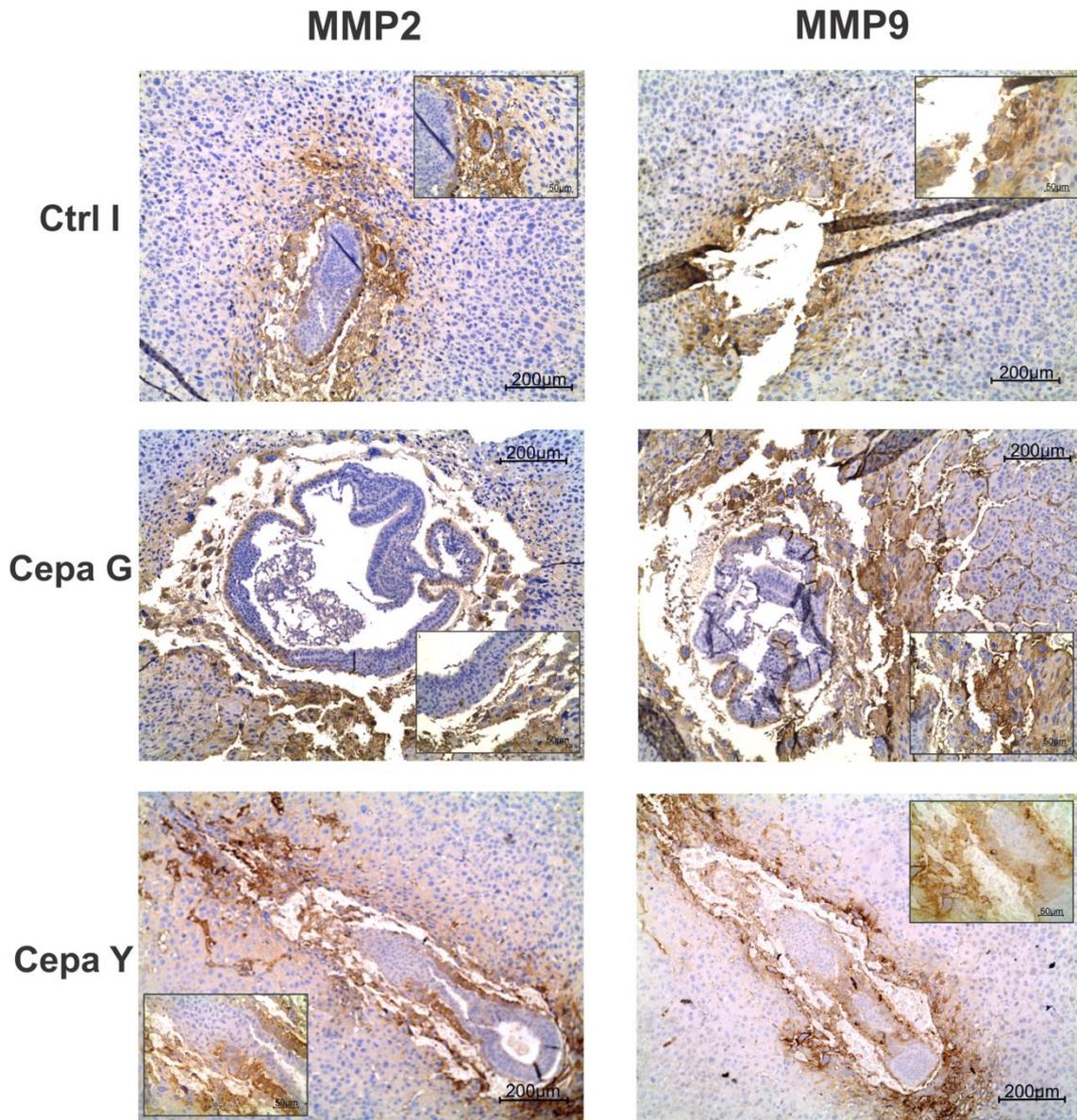


Figura 4: Identificação de MMP2 e MMP9 em tecidos embrionários. Corte de embrião de oito dias no controle I e na cepa Y e de 9 dias na cepa G. Grupos infectados depois da rolha vaginal. Todos os grupos expressaram uma quantidade semelhante de MMP2 e de MMP9. No controle I destaque de uma célula trofoblástica expressando MMP2. Aumento de 40x.

5.3 Análise de infiltrado inflamatório

Após a análise de MMPs através de IHC-P cortes histológicos foram corados com HE para avaliar infiltrado inflamatório nos tecidos. A infecção por *T. cruzi* mostrou ser capaz de aumentar a presença de células do sistema imune no útero de fêmeas que estavam apenas infectadas (Controles II e III), quando comparado com cortes de útero de fêmeas não gestantes (Controle IV). Analisando os embriões, tanto em fêmeas infectadas quanto em fêmeas do grupo controle (Controle I) houve presença de células do sistema imune próximas à luz uterina, local de contato com o embrião (Figuras 5 e

6). Fêmeas gestantes apresentaram um processo inflamatório menos intenso em relação às fêmeas apenas infectadas. Também puderam ser observadas características específicas como: aumento de neutrófilo em fêmeas apenas infectadas; quantidade semelhante de linfócitos em todos os grupos; presença de plasmócitos em útero de fêmeas do grupo Yantes; diminuição de eosinófilo em embriões e presença de necrose nos grupos de fêmeas que foram infectadas antes da rolha vaginal (Tabela 2).

Tabela 2: Caracterização qualitativa e semi-quantitativa de processo inflamatório em cortes de embrião e /ou útero. As características foram classificadas de acordo com a intensidade, ausente (-), baixo (+), moderado(++) e intenso (+++).

	Controle I	Controle II	Controle III	Controle IV	G antes	G depois	Y antes	Y depois
Neutrófilo	++	+++	++	+	+	+	+	+
Linfócito	+	+	+	+	-	+	+	+
Plasmócito	-	-	-	-	-	-	++	-
Macrófago	+++	+	+	+	++	++	+	++
Células Gigantes	-	-	-	-	-	-	-	-
Eosinófilo	+	+++	+	+	-	-	+	-
Necrose	-	-	-	-	+	-	++	-
Intensidade	++	+++	+	+	++	+	++	+

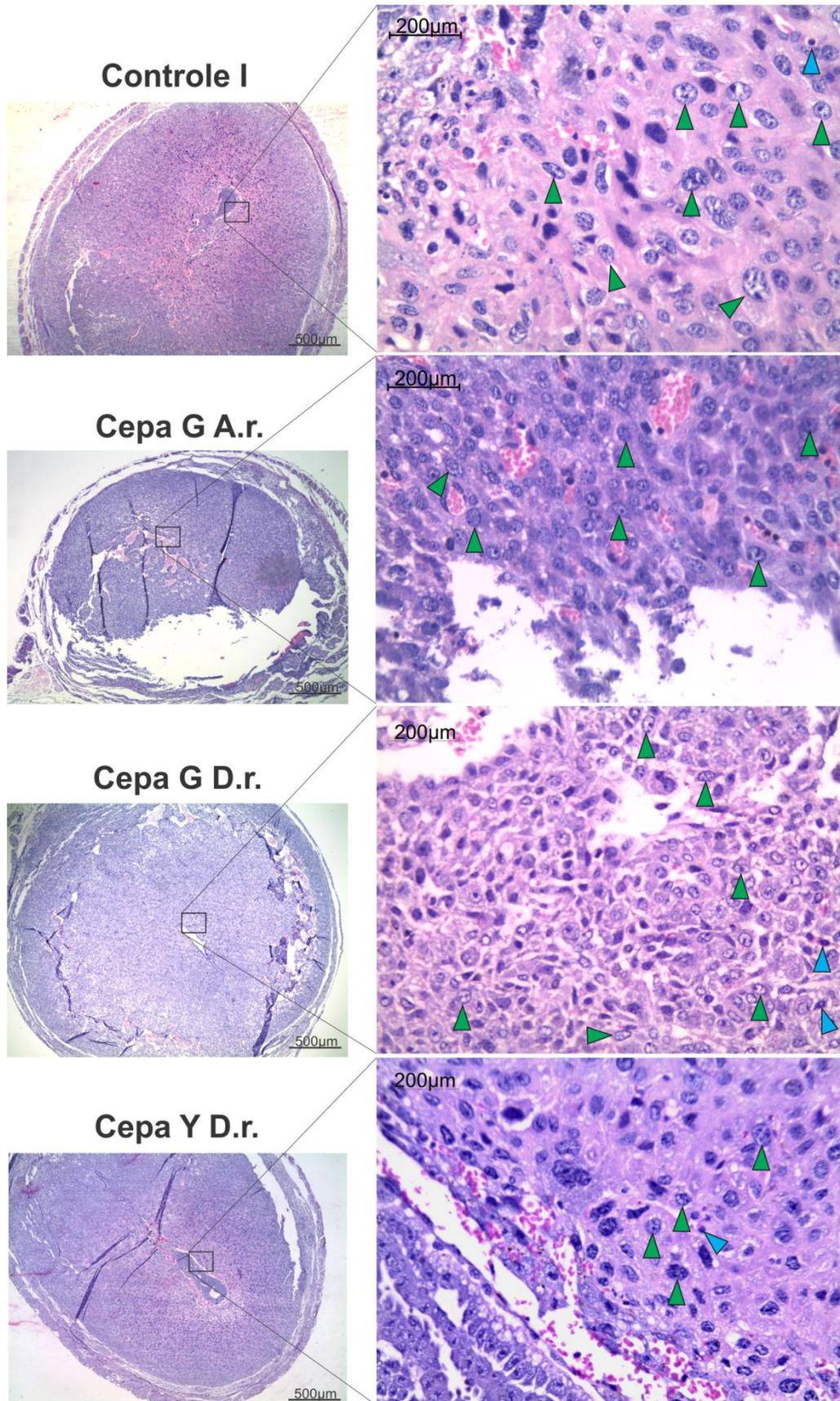


Figura 5: Coloração em HE evidenciando células do sistema imune em cortes de embrião Em azul: neutrófilo; verde: macrófago;. Aumento de 4x à esquerda e de 40x à direita.

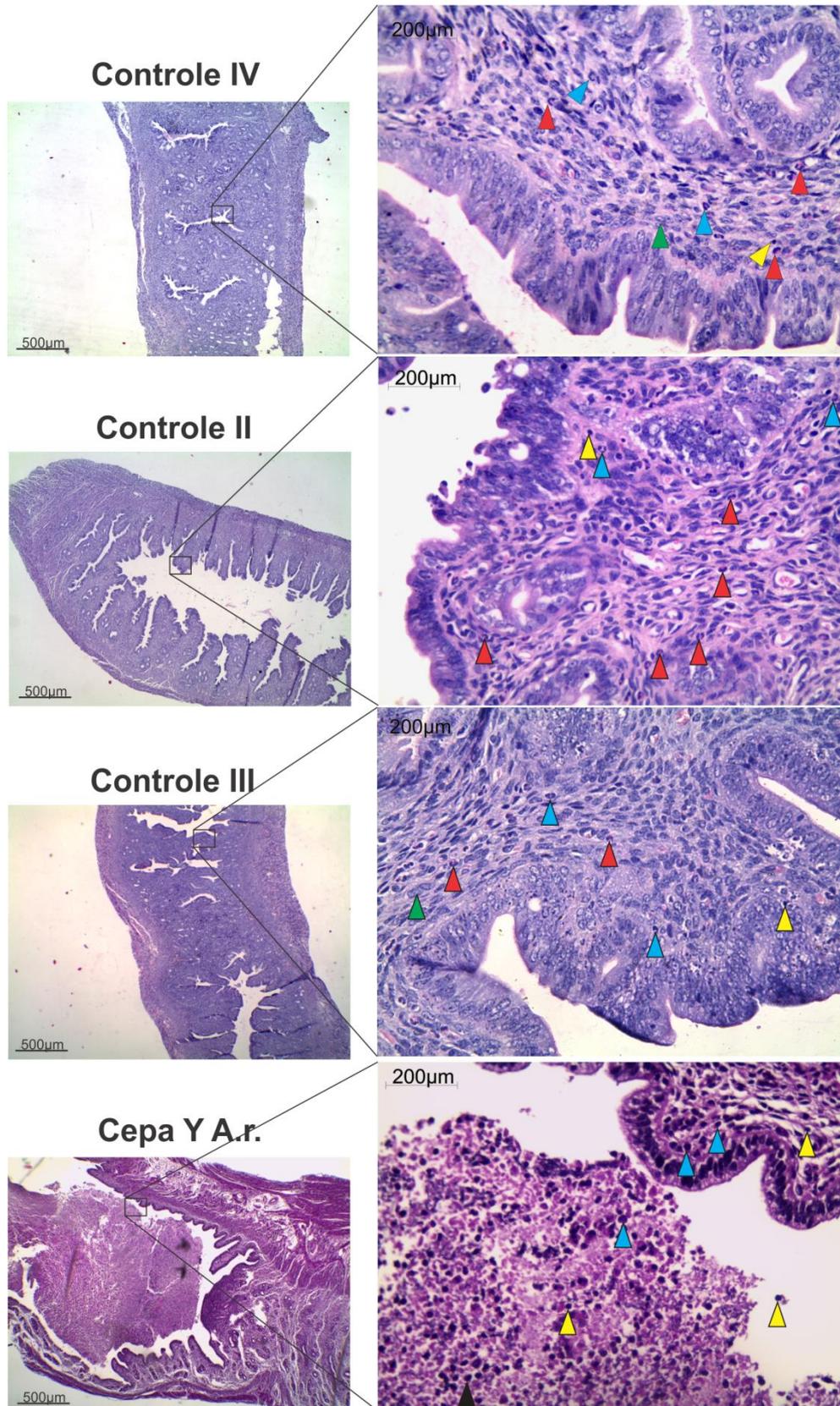


Figura 6: Coloração em HE evidenciando células do sistema imune em cortes de útero. Em azul: neutrófilo, amarelo: linfócito; preto: plasmócito; verde: macrófago; vermelho: eosinófilo e laranja: área de necrose. Aumento de 4x à esquerda e de 40x à direita.

5.4 Análise de citocinas

A dosagem de citocinas foi feita em sobrenadante de tecido de baço das fêmeas para avaliar perfil de resposta imune sistêmico. Os dados mostraram um aumento de IFN- γ , citocina característica de perfil Th1, em tecidos de fêmeas infectadas antes da rolha vaginal em ambas as cepas, com aumento maior na cepa Y, quando comparado com o grupo controle. No caso da citocina IL-1 β , também de perfil Th1, houve aumento apenas no grupo de fêmeas infectadas com a cepa Y antes da rolha vaginal. Outra citocina de perfil Th1 dosada, TNF- α não apresentou diferença entre os grupos. A citocina de perfil Th2, IL-4, apresentou aumento significativo no grupo de fêmeas infectadas com a cepa Y antes da rolha vaginal e em fêmeas infectadas com a cepa G depois da rolha vaginal (Figura 7).

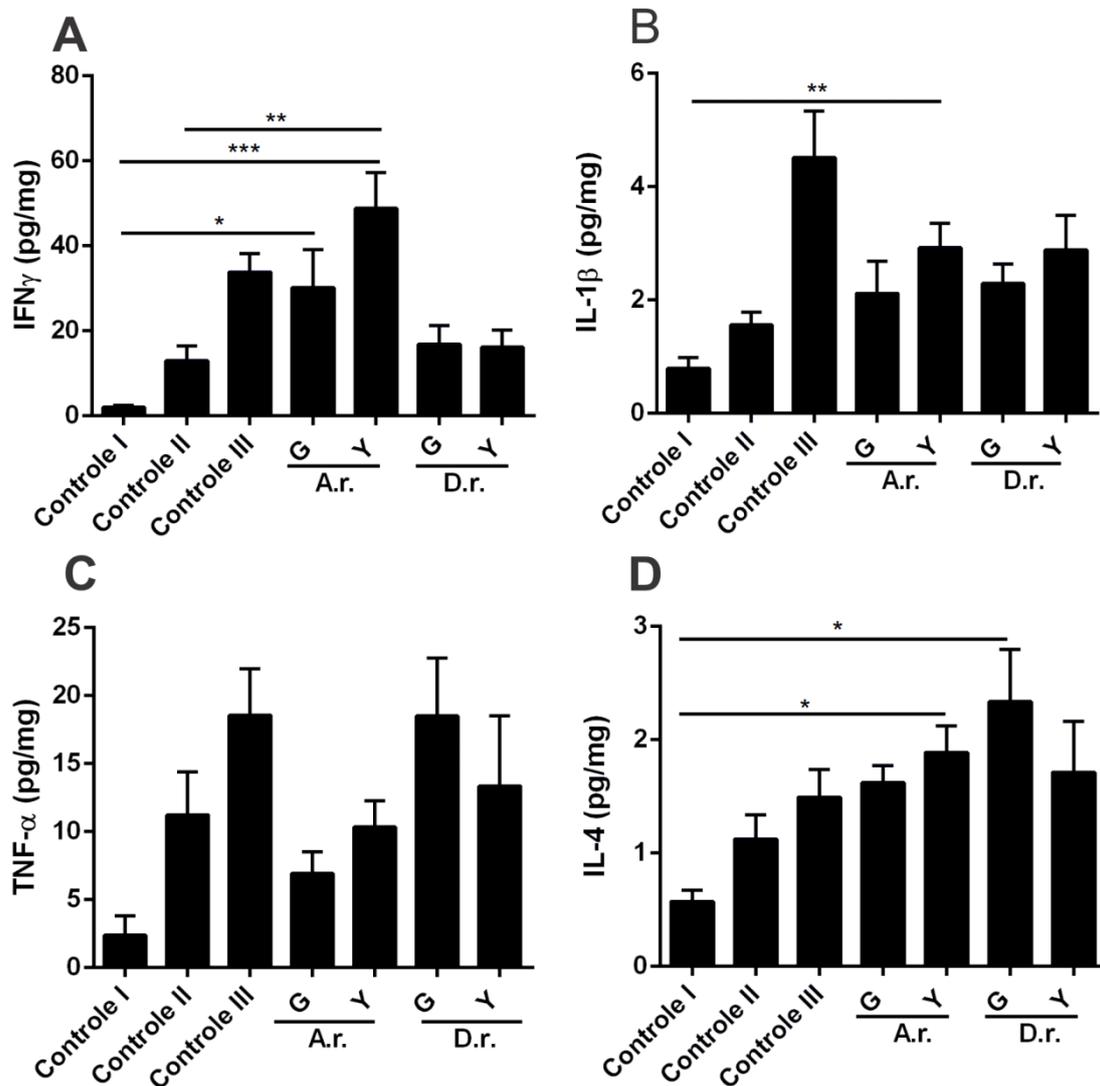


Figura 7: Gráficos da dosagem de citocinas em sobrenadante de baço de fêmeas infectadas. (A) Houve aumento de IFN- γ em tecidos de fêmeas infectadas antes da rolha vaginal em ambas as cepas, com aumento maior na cepa Y, quando comparado com o grupo controle I e II. (B) No caso da citocina IL-1 β houve aumento apenas no grupo de fêmeas infectadas com a cepa Y antes da rolha vaginal. (C) A citocina TNF- α não apresentou diferença entre os grupos. (D) A citocina de perfil Th2, IL-4, apresentou aumento significativo no grupo de fêmeas infectadas com a cepa Y antes da rolha vaginal e em fêmeas infectadas com a cepa G depois da rolha vaginal. Diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5.5 Detecção do parasita

As alterações observadas no ambiente embrionário e/ou uterino nos levaram a buscar pela presença do parasita nesse material. Devido à dificuldade de se achar o parasita da cepa G em tecidos, para a pesquisa dessa cepa foi feita uma qPCR que mostrou uma diminuição da carga parasitária quando as fêmeas estavam gestantes (análise feita em sítios de implantação), quando comparadas com o grupo controle, fêmeas apenas infectadas com a cepa G (análise feita em útero) (Figura 8).

A pesquisa pela presença de parasitos da cepa Y em tecido foi feita por meio de reação de imunofluorescência. Pelos resultados da imunofluorescência acreditamos haver uma maior quantidade de parasitos quando foi analisado o útero das fêmeas apenas infectadas com a cepa Y (controle III), quando comparado com cortes de embriões de fêmeas infectadas após a rolha vaginal (Figura 9).

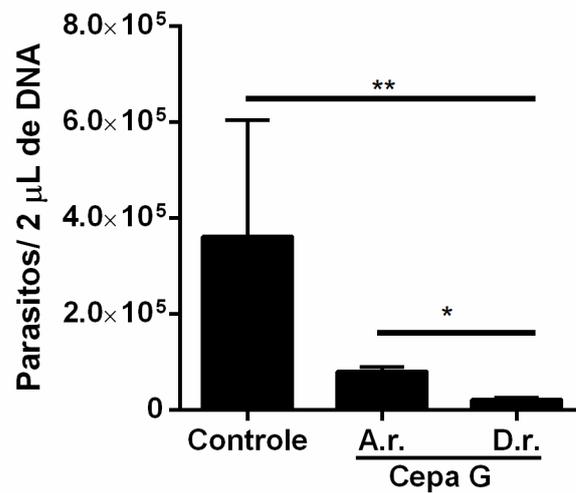


Figura 8: Pesquisa de parasitos da cepa G em útero e/ou sítio de implantação por qPCR. Houve uma maior quantidade de detecção no controle em relação aos grupos gestantes, e quando foi comparado os tempos de infecção, antes ou depois da rolha. Dados considerados significativos quando $p < 0,05$

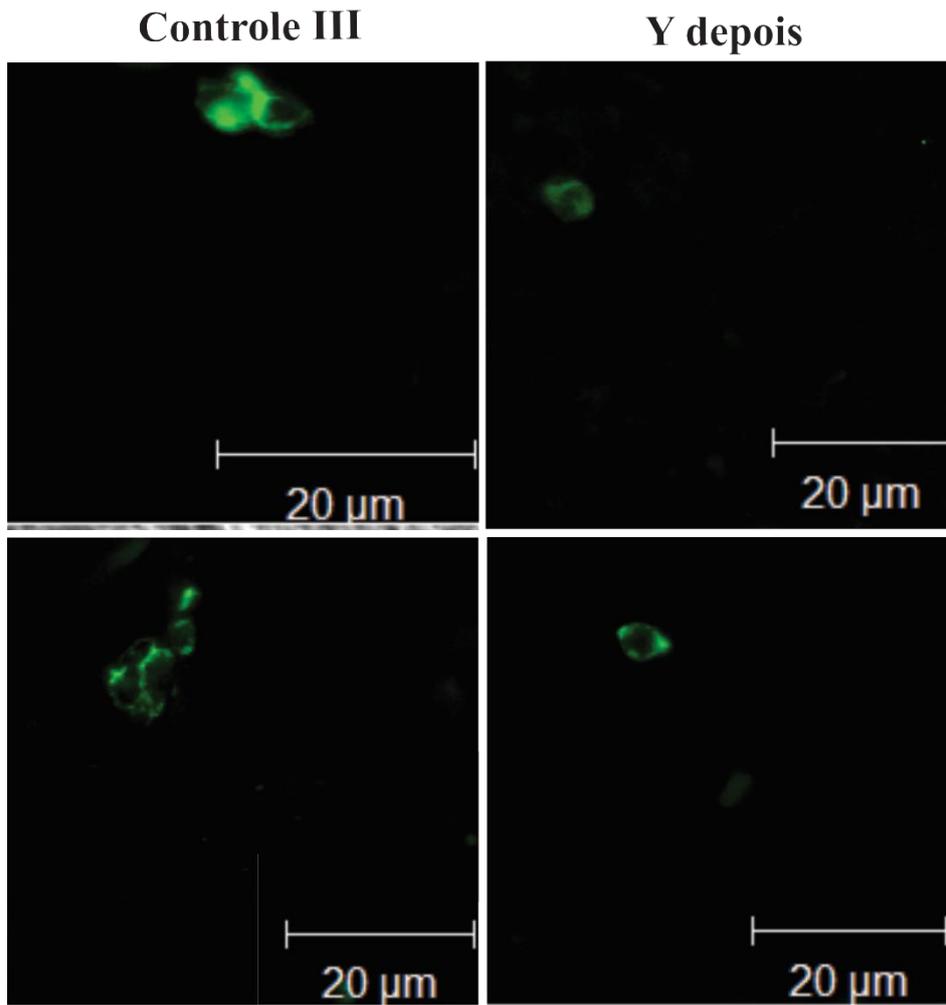


Figura 9: Detecção de parasitos da cepa Y em tecido uterino no controle III e em cortes de embrião (fêmeas gestantes) no grupo Y depois. *T.cruzi* marcado em verde com anti-rabbit Alexaflúor® 488

6. DISCUSSÃO

Esse trabalho demonstrou alterações encontradas no útero de fêmeas apenas infectadas, maior intensidade de resposta inflamatória e a detecção do parasita em fêmeas apenas infectadas. O balanço da resposta imunológica sistêmica contra a infecção e manutenção da gestação também foram verificados. A gestação pareceu ser capaz de controlar a infecção, apenas quando esta ocorreu após o início da gestação, levando a uma diminuição na intensidade de células do sistema imune no ambiente uterino e da carga parasitária. A resposta imunológica sistêmica foi mais intensa quando a infecção ocorreu antes do acasalamento. Este fenótipo levou a uma menor porcentagem de fêmeas gestantes. Esta questão fica bastante evidente em fêmeas infectadas com a cepa Y antes do acasalamento.

Estudos anteriores mostraram a associação entre a fase aguda da infecção por *T.cruzi* e a infertilidade em camundongos. Infertilidade essa independente de anormalidade em eventos normais como: ovulação, fertilização e clivagem do zigoto, estando associada a uma falha na implantação do blastocisto em fêmeas infectadas, por um efeito altamente deletério causado pela infecção. Essa falha, associada a um retardo nas divisões dos blastômeros levando a uma formação anormal do blastocisto e consequente falha na implantação, se mostrou prejudicial para o desenvolvimento gestacional. É possível que esse feito agressor e deletério que ocorre entre o acasalamento e a implantação esteja relacionado com a alta carga parasitária e consequentemente à virulência das cepas de *T.cruzi* (BOUFKER et al, 2006; CEING et al 2013). Nossos dados corroboram a proposição descrita acima. Ressaltamos o fato de que nenhuma das fêmeas previamente infectadas com a cepa Y foi capaz de engravidar, enquanto que cerca de 40% de fêmeas infectadas com a mesma cepa, alguns dias após a rolha vaginal, engravidaram.

Para entender melhor esse efeito prejudicial resolvemos analisar alguns fatores importantes envolvidos do início à metade da gestação. Analisando a presença de MMPs, nossos resultados demonstram um padrão de marcação para tais enzimas semelhante entre os grupos, não nos permitindo inferir uma relação entre as MMPs, a infecção e a gestação. Embora frequentemente a expressão de MMPs esteja associada à presença de macrófagos, células identificadas no tecido uterino em todos os grupos,

com uma frequência um pouco mais marcante em fêmeas apenas gestantes (PARKS; WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004; LOKE; KING, 1995).

A análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório chamou a atenção pela grande quantidade de células do sistema imune, principalmente de macrófagos, em cortes histológicos de embriões, com uma presença mais acentuada no grupo apenas gestante. Estudos recentes mostraram que da fase inicial até a metade da gestação os leucócitos uterinos chegam a representar de 30 a 40% do total de células do endométrio. Entre eles, se destacam as células NK uterinas e macrófagos decíduais. Que possuem papel importante na invasão de células trofoblásticas, remodelamento da artéria espiral, estão diretamente relacionados com a expressão de MMPs e com uma resposta imune em casos de uma possível infecção. Outras células pouco abundantes são as DCs e as células T, que estão supostamente envolvidas na tolerância imunológica (AREK; HECHER, 2013). Podemos associar a presença desses macrófagos também com uma possível resposta à infecção, já que Likens e colaboradores (2010) demonstraram pela primeira vez *in vivo*, a importância específica da ativação de macrófagos diretamente mediada por citocinas pro inflamatórias para o controle da infecção de protozoários, (LYKENS et al, 2010).

Neste trabalho também observamos a presença de neutrófilos em todos os grupos, chamando a atenção a maior quantidade dessas células no útero de fêmeas infectadas e não gestantes quando comparadas com as fêmeas infectadas e gestantes, em ambas as cepas. Neutrófilos raramente são encontrados em tecidos periféricos saudáveis, sendo encontrados somente em locais onde exercem forte ação antibacteriana (RINALDI et al, 2014). Dessa forma, podemos associar esse aumento de neutrófilos em útero de fêmeas apenas infectadas, como uma possível tentativa de contenção do parasitismo, considerando que foram encontrados parasitos nesses tecidos.

Para entender a participação principalmente de neutrófilos presentes no útero durante a gestação, Zhao e colaboradores em 2015 demonstraram que, enquanto o infiltrado de neutrófilos imaturos poderia limitar a expansão de células T e DCs no útero, os neutrófilos teriam um papel crítico em resposta à inflamação sistêmica. Além disso, os dados também mostraram que o perfil de subpopulações de células mielóides circulantes poderia alterar diretamente o microambiente uterino local via a infiltração tais células. Essas células podem, por sua vez, afetar macrófagos e células NK

residentes, levando ao comprometimento do remodelamento da artéria espiral e uma invasão trofoblástica anormal, resultando numa placentação deficiente e consequente falha gestacional. Sabendo desse papel de neutrófilos como reação a uma resposta imune sistêmica, nos chama atenção o fato dessa população de células estarem aumentada em útero de fêmeas apenas infectadas, mostrando realmente essa resposta local contra uma ação sistêmica para combater a infecção. A diminuição dessas células nos grupos de fêmeas infectadas e gestantes, principalmente naqueles grupos em que menos fêmeas engravidaram, poderia ser um fator a mais prejudicando o sucesso da gestação na contenção local da inflamação sistêmica.

Como já discutido, durante a gestação o sistema imune materno passa por significativas adaptações não só para prevenir rejeição ao feto semi-alogênico, mas também para preservar a habilidade de defesa em resposta a uma infecção. Estudos em modelos murinos e humanos apontam uma forte associação entre a imunidade materna do tipo Th2 e o sucesso da gestação; enquanto uma reação imune do tipo Th1 pode estar associada com uma perda gestacional (ERLEBACHER 2013). Essa prevalência de perfil Th1 pode ser associada à dosagem de IFN- γ , aumentada principalmente no grupo de fêmeas que não conseguiram engravidar, mais um dano causado pela infecção à gestação.

A infecção anterior ao quadro gestacional pareceu exigir um controle maior por parte do organismo dos animais, como aumento de citocinas de perfil pró-inflamatório. Como foi o caso do aumento de IFN- γ nos dois grupos de fêmeas infectadas antes da rolha vaginal, com um aumento maior no grupo de fêmeas infectadas com a cepa Y e que não engravidaram. IFN- γ é um importante mediador de resistência à *T.cruzi*, estudos feitos por Rodrigues e colaboradores em 2012 mostrou susceptibilidade de amastigotas de cepa G de *T.cruzi* a essa citocina, um papel crucial e único no controle da infecção. IFN- γ também regula a expressão de uma grande diversidade de genes em tipos celulares como as NKs, incluindo quimiocinas e receptores de quimiocinas, que mostram ter papel preponderante na proteção contra *T.cruzi* mediada por IFN- γ . No início da infecção, IFN- γ é secretado por células NK e outros tipos celulares, como parte da resposta inata, e mais tardiamente no curso da infecção pela ativação de células T CD4+ e CD8+ (GAZZINELLI et al, 1992; HÖLSHER et al, 1998; ALIBERTI et al, 2001).

Ainda no contexto da prevalência de perfil Th1, o grupo de fêmeas infectadas com a cepa Y em que nenhuma das fêmeas engravidou apresentou um aumento de IL-1 β . Tal citocina é descrita como mediador pró-inflamatório, tendo efeito regulatório na expressão gênica, incluindo na regulação positiva na secreção de citocinas, assim como na resposta imune adaptativa, estimulando o desenvolvimento de linfócitos ativados (LUHESHI; ROTHWELL; BROUGH, 2009). Outra propriedade pro-inflamatória importante de IL-1 β é sua habilidade em aumentar a expressão de moléculas de adesão. Tais propriedades promovem o recrutado de células inflamatórias, tais como neutrófilos e leucócitos. IL-1 β também atua como fator angiogênico, tendo papel importante na formação de vasos, auxiliando na produção do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) (VORONOV et al, 2003). Foi demonstrado que em camundongos deficientes de IL-1 β , VEGF não é capaz de estimular a formação de vasos sanguíneos (DINARELLO, 2009). Além disso, a atividade de VEGF está envolvida no crescimento e estabilidade da placenta (WANG et al, 2015). Essa dualidade na ação de IL-1 β tanto a favor quanto prejudicial para o desenvolvimento da gestação suporta a ideia da necessidade de uma regulação precisa e eficaz da resposta imune por parte do organismo, regulação essa que acaba sendo afetada com a presença da infecção. Podendo ocasionar danos incompatíveis com o sucesso gestacional.

Estudos feitos em nosso laboratório mostraram um aumento de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 na fase inicial da infecção por *T.cruzi*, independente da virulência da cepa (RODRIGUES et al, 2015). Outro fator associado à citocina IL-4 é a capacidade de regular a atividade de macrófagos, com tendência a um perfil M2 que pode levar a inibição de receptor de VEGF e consequente diminuição de angiogênese (HART et al, 1999; WU et al, 2015). Essa ação de IL-4 mostra a necessidade de um balanço entre perfis de resposta imune e não uma prevalência, considerando o aumento de tal citocina em grupos onde algumas fêmeas não foram capazes de engravidar. O aumento de IL-4 a nível sistêmico em resposta à infecção poderia levar a uma alteração local, como por exemplo, a diminuição da angiogênese.

De forma resumida a participação de células imunes no ambiente uterino em resposta a um perfil de resposta sistêmico faz com que a interface materno-fetal torne-se imunotolerante para suportar o desenvolvimento tanto placentário quanto fetal. A supressão de células T juntamente com a falha de células dendríticas em apresentar antígenos parece ter um papel chave nesse processo. Além da atuação de neutrófilos

para conter a resposta sistêmica. A falha na sucessão de todos esses acontecimentos complexos interfere no tempo e na coordenação das mudanças de células imunes no início da gestação, podendo causar uma má formação placentária, resultando na falha gestacional (ZHAO et al, 2015).

Por serem cuidadosamente moduladas no momento inicial da gestação, todas essas alterações juntas podem colaborar com a dificuldade de fêmeas infectadas com a cepa Y em desenvolverem a gestação. E justamente por ter essa alta regulação, ainda que as fêmeas estejam infectadas, é possível que a maquinaria local seja capaz de conter a resposta sistêmica contra a infecção, permitindo a continuidade da gestação em alguns casos.

Juntos nossos resultados levantam algumas questões como: o mecanismo pelo qual a cepa mais virulenta de *T.cruzi* (Y) interfere nos momentos iniciais da gestação; até onde a influência da infecção causa danos em úteros de fêmeas não gestantes, e quais os prejuízos desses danos para gestações futuras.

Em conclusão, podemos perceber que quando a infecção ocorre antes da gestação ela se torna prejudicial, principalmente por uma cepa com maior virulência. Por outro lado, quando a fêmea já está gestante e a infecção ocorre após esse início, apesar da resposta imune sistêmica para conter tal infecção, a resposta local de tolerância consegue diminuir os danos a favor da manutenção da gestação.

7. CONCLUSÃO

- Fêmeas infectadas com a cepa Y antes do início da gestação apresentam maior dificuldade de engravidar;
- Fêmeas que são infectadas após o início da gestação são capazes de controlar a infecção e manter a gestação;
- Não houve diferença na marcação para MMP2 e MMP9 em tecidos embrionários entre as cepas;
- Citocinas como IFN γ , IL-1 β e IL-4 apresentaram aumento em fêmeas infectadas;
- Todos os tecidos apresentaram células do sistema imune, com maior intensidade naqueles tecidos de grupos infectados.

8. REFERÊNCIAS

- ALIBERTI, J. C.; SOUTO, J. T.; MARINO, A. P.; LANNES-VIEIRA, J.; TEIXEIRA, M. M.; FARBER, J.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. **American Journal Pathology**, v. 158, p. 1433-40, 2001.
- ALTCHEH, J.; MOSCATELLI, G.; MORONI, S.; GARCIA-BOURNISSEN, F.; FREILIJ, H. Adverse events after the use of benznidazole in infants and children with Chagas disease. *Pediatrics*, v. 127, e218, 2011.
- ALVES, M. J.; MORTARA, R. A. A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104 (Suppl. 1), p.76-88, 2009.
- ANDRADE, Z.A. - Immunopathology of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94(suppl. 1): 71-80, 1999
- ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R.; CHIARI, E.; PENA, S.D.; MACEDO, A.M. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Experimental Parasitology**, v.100, p. 269-275, 2002.
- APPLIED BIOSYSTEMS, Real-Time PCR handbook. 2nd Edition, 2012
- AREK, P. C., HECHER, K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. **Nature Medicine**., v. 19, p. 548-556, 2013..
- BARRETO, M.P. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas** (BRENER, Z., ANDRADE, Z.A. Eds.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 89-151, 1979.
- BILATE, A. M.; CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 67-74, 2008.
- BOUFKER, H. I.; ALEXANDRE, H.; CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Infertility in murine acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with inhibition of pre-implantation embryo development. **The American Journal of Pathology**, v. 169, p.1730- 1738, 2006.
- BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*, **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.5, p.220-224, 1963.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Microbiology**, v. 27, p. 347 –382, 1973.

- BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1803, p. 55-71, 2010.
- BURLEIGH, B.A.; ANDREWS, N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 175 – 200, 1995.
- CASTILLO, C. ; LÓPEZ-MUÑOZ, R. ; DUASO, J. ; GALANTI, N. ; JAÑA, F. ; FERREIRA, J. ; CABRERA, G. ; MAYA, J. D. Role of metalloproteinases 2 and 9 in ex vivo *Trypanosoma cruzi* infection of human placental chorionic villi. **Placenta**, v. 33, p. 991-997, 2012.
- CARLIER Y. ; DIAS J. C. P.; LUQUETTI A. O. ; HONTEBEYRIE M. ; TORRICO F. ; TRUYENS C. Trypanosomiase américaine ou maladie de Chagas. **Encyclopédie Médico-Chirurgicale**, v. 8, p. 505 – 520, 2002.
- CENCIG, S. ; COLTEL, N. ;TRUYENS, C. ; CARLIER, Y. Fertility, gestation outcome and parasite congenital transmissibility in mice infected with TcI, TcII and TcVI genotypes of *Trypanosoma cruzi*. **Plos Negl. Trop. Disea**, v. 7, e2271, 2013.
- CHAGAS, C. - Nova Tripanomíase humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico da nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 1: 159-218, 1909.
- CHIEFFI, P. P. ; AMATO NETO, V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*, **História sobre a doença de Chagas no Brasil** v.44 p. 69-72, 2011.
- DIAS, E.; LARANJA, F.S.; MIRANDA, A. & NOBREGA, G. - Chagas' disease: a clinical, epidemiologic, and pathologic study. **Circulation**, v. 14: p. 1035-1060, 1956
- DIAS, J. C. P.; MACÊDO V. O. Doença de Chagas. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**, Rio de Janeiro, p. 557-594, 2005.
- DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, p.S13-S22, 2007
- DINARELLO, C. A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 519–50, 2009.
- DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Cell Biology**, v. 86, p. 197 – 283, 1984.
- DE SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 88-126, 2000.
- DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Disease**, v.21, p.287-292, 2008.

DUTRA, W.O.; MENEZES, C.A.; VILLANI, F.N.; DA COSTA, G.C.; DA SILVEIRA, A.B.; REIS, D.; GOLLOB, K.J. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104 (Supl I), p.208-218, 2009.

ERLEBACHER, A. Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. **Nat. Rev. Immunol**, v. 13, p. 23-33, 2013.

FRAGATA FILHO, A. A.; CORREIA, E. B.; BORGES FILHO, R. VASCONCELOS, M. O.; JANCZUK, D. MARTINS, C. S. S. Sequência de transmissões não habituais da infecção chagásica em uma mesma família: transfusional para a mãe e congênita para o filho, de cepa de *Trypanosoma cruzi* resistente ao tratamento. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 1, p.73-75, 2009.

FREITAS, H.F.; CHIZZOLA, P.R.; PAES, A.T.; LIMA, A.C. & MANSUR, A.J. - Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of Chagas' heart disease. **Int. J. Cardiol.**, 102: 239-247, 2005

FREITAS, J.M.; ANDRADE, L.O.; PIRES, S.F.; LIMA, R.; CHIARI, E.; SANTOS, R.R.; SOARES, M.; MACHADO, C.R.; FRANCO, G.R.; PENA, S.D.; MACEDO, A.M. The MHC gene region of murine hosts influences the differential tissue tropism of infecting *Trypanosoma cruzi* strains. **PLoS One**, v.4, p. 1-4, abr. 2009.

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

GÜRTLER, R. E.; SEGURA, E. L.; COHEN, J. E. Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* Infection in Argentina. **Emerging Infectious Disease**, CDC, v. 9, p.29-32, 2003.

HERNÁNDEZ-OSORIO, L.A.; MÁRQUEZ-DUEÑAS, C.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L.E.; BALLESTEROS-RODEA, G.; MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; MANNING-CELA, R.G. Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p.1-10, 2010.

HÖLSCHER, C.; KÖHLER, G.; MÜLLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G. A. 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**, v. 66, p. 1208–1215, 1998.

Instituto Oswaldo Cruz. Doença de Chagas na Europa. 2011. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infolid=1102&sid=32>>. Acesso em: 06 ago. 2015

JACKSON, Y.; MYERS, C.; DIANA, A.; MARTI, H. P.; WOLV, H.; CHAPPUIS, F.; LOUTAN, L.; GERVAIX, A. Congenital Transmission of Chagas Disease in Latin American Immigrants in Switzerland. **Emerging Infectious Disease**, CDC, v 15, p.601-603, abr. 2009.

LEY, V.; ANDREWS, N.W.; ROBBINS, E.S.; NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v.168, p.649-659, 1988.

LOKE, W. Y.; KING, A. **Human Implantation: Cell Biology and Immunology**. Cambridge: Medicine & Health Science Books, 1995. 299 p.

LUHESHI, N. M.; ROTHWELL, N. J.; BROUGH, D. Dual functionality of interleukin-1 family cytokines: implications for anti-interleukin-1 therapy. **Journal of Pharmacology**, v. 157, p. 1318–1329, 2009.

LYKENS, J. E.; TERRELL, C. E.; ZOLLER, E. E.; DIVANOVIC, S.; TROMPETTE, A. Mice with a selective impairment of IFN-gamma signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN-gamma-activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections in vivo. **J Immunol**, v 184, p. 877–885, 2010.

MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p.1-12, 2004.

MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on surface of HeLa cells. **Experimental Parasitology**, v. 73, p. 1-14, 1991.

MORTARA, R. A.; ANDREOLI, W. K.; TANIWAKI, N. N.; FERNANDES, A. B.; SILVA, C. V.; FERNANDES, M. C. D. C.; L'ABBATE, C.; da SILVA, S. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 77-94, 2005.

MORTARA, R. A.; ANDREOLI, W. K.; FERNANDES, M. C.; SILVA, C. V.; FERNANDES, A. B.; L'ABBATE, C.; da SILVA, S. Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. **Sub-cellular Biochemistry**, v. 47, p. 101-109, 2008

MOYA, P., MORETTI, E. Doença de Chagas Congênita. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. **Uma abordagem prática para o clínico Geral**. p. 383-410, 1997.

NOTARIO, A. F. O. Aspectos macroscópicos e imunológicos da gestação em camundongos experimentalmente infectados por *Trypanosoma cruzi*. 48 f. **TCC (Graduação)** - Curso de Biomedicina, Icbim, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013

- PARKS, W. C., WILSON, C. L., LÓPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews**, v. 4, p. 617-629, 2004
- PAN, S.C. *Trypanosoma cruzi*: In vitro interactions between cultured amastigotes and human skin-muscle cells. **Experimental Parasitology**, v.45, p.274-286, 1978.
- PIAT, G. L.; ALMIRÓN, J. F.; ROMANO, J. R.; ROMANO, M. F. Chagas congenito revision de uma enfermidade curable y subestimada. **Revista de Posgrado de La Via Cátedra de Medicina**, v. 193, p.16-21, 2009.
- RASSI, A. J., RASSI, A., RASSI, S. Predictors of Mortality in Chronic Chagas Disease: A Systematic Review of Observational Studies. **Circulation**, v. 115, p. 1101 – 1108, 2007
- RÊGO, S. F. M. Sobre o encontro de formas tissulares do *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909) no sangue circulante de camundongo branco (*Mus musculus*). **Folia Clinica et Biologica**, v.26, p.17-45, 1956
- RINALDI, S. F.; CATALANO, R. D.; WADE, J.; ROSSI, A. G.; NORMAN, J. E. Decidual neutrophil infiltration is not required for preterm birth in a mouse modelo f infection-induced preterm labor. **J Immunol**, v. 192, p. 2315-2325, 2014.
- ROBERTS, C. W.; WALKER, W.; ALEXANDER, J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites, **Clin. Microbio. Rev**, v. 14, p. 476- 488, 2001.
- RODRIGUES, C.M.; VALADARES, H.M.; FRANCISCO, A.F.; ARANTES, J.M.; CAMPOS, C.F.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; ARAUJO, M.S.; ARANTES, R.M.; CHIARI, E. FRANCO, G.R.; MACHADO, C.R.; PENA, S.D.; FARIA, A.M.; MACEDO, A.M. Coinfection with different *Trypanosoma cruzi* strains interferes with the host immune response to infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.4, p. e846, 2010.
- RODRIGUES, A. A.. Estudos da Interação *Trypanosoma cruzi*-hospedeiro mamífero enfatizando a resposta imunológica e caracterização biológica da proteína P21 do parasito. 2015. 161 f. **Tese (Doutorado)** - Curso de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.
- ROSENBERG, G. A. Matriz metalloproteinases and their multiple rolas in neurodegenerative diseases. **Lancet Neurol**, v. 8, p.205-216, 2009.
- SCHMUNIS, G. A., YADON, Z. E. Chagas disease, a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Trop** v. 115, p. 14–21, 2010.
- SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 83, p. 141-152, 1996.
- THIRUCHEVAM, U., DRANSFIELD, I., SAUNDERS, P. T., CRITCHLEY, O. The importance of the macrophages within the human endometrium. **J. Leukoc. Biol**, v. 93, p. 217-225, 2013.

VASCONCELLOS, L. S.; SABINO, K. R.; PETROIANU, A.; SIMAL, C., J., R. Atividade fagocitária do sistema mononuclear fagocitário na gravidez. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Belo Horizonte, v. 25, p.213-218, 2003.

VORONOV, E., SHOUVAL, D. S., KRELIN, Y., CAGNANO, E., BENHARROCH, D. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, p. 2645–50, 2003.

WANG, J.; TAO, Y. M.; CHENG, X. Y.; XHU, T. F., CHEN, Z. F., YAO, H.; SU, L. X. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell activity in hypertensive disorders of pregnancy. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, p. 3781- 3786, 2015.

WEGMANN, T. G.; LIN, H.; GUILBERT, L.; MONSMANN, T., R. B&reconal cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a T.2 phenomenon? **Immunology Today**, v. 14, p.353-356, 1993

YOSHIDA, N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v.40, p.836-839,1983.

ZHAO, H.; KALISH, F.; SCHULZ, S.; YANG, Y.; WONG, R. J.; STEVENSON, D. K. Unique roles of infiltrating myeloid cells in the murine uterus during early to midpregnancy. **The Journal of Immunology**, v. 194, p. 3713-3722, 2015

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G.; SECOND SATELLITE MEETING. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p.1051-1054, 2009.

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 101/15 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 040/15

Projeto Pesquisa: "Impacto da presença de células-tronco fetais na fisiopatologia da cardiomiopatia chagásica materna"

Pesquisador Responsável: Cláudio Vieira da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 02 de junho de 2015.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

APÊNDICE I

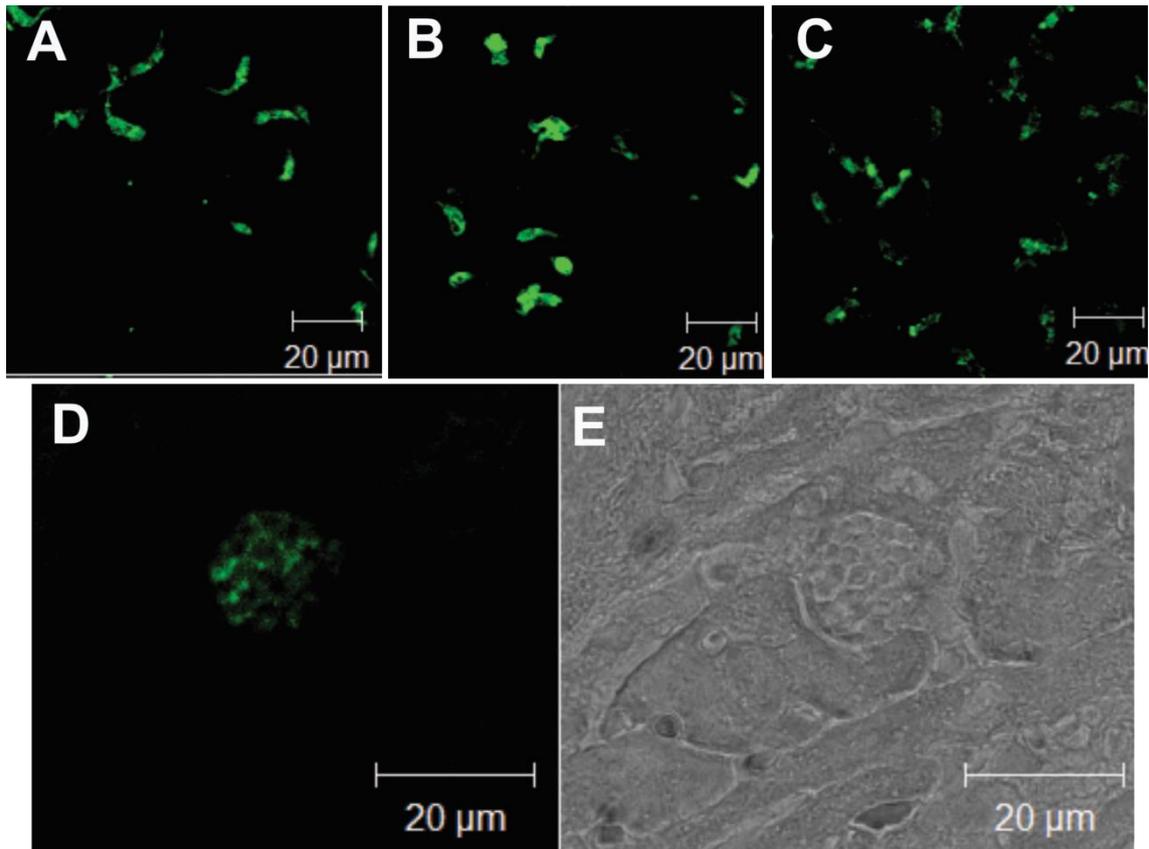


Figura 10. Teste do anticorpo produzido anti- *T. cruzi*. Em (A), (B) e (C) teste do soro de coelho em cultura de TCT de *T. cruzi* da cepa G nas diluições de 1:100, 1:500 e 1:1000 respectivamente. Em (D) e (E) testes in vivo em cortes de corações chagásicos. Em (D) o parasito marcado em verde com anti-rabbit Alexa fluor488® e em (E) o mesmo corte em contraste de fase, evidenciando o ninho de amastigotas de *T. cruzi*. Microscopia Confocal.

