

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
PPGCBIOL

Dissertação

**Perfil de mediadores
inflamatórios produzido por
células da linhagem J774
após estímulo *in vitro* com a
IL-33 e antígeno/parasito o
*Trypanosoma cruzi***

Daniela Silva de Oliveira

Ouro Preto
2020



DANIELA SILVA DE OLIVEIRA

Perfil de mediadores inflamatórios produzido por células da linhagem J774 após estímulo *in vitro* com a IL-33 e antígeno/parasito o *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas. **Área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.**

Orientador: Prof. Dr. André Talvani

Co-orientadora: Dra. Luiza Perucci

OURO PRETO- MG

Março de 2020

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

O48p Oliveira, Daniela Silva de.

Perfil de mediadores inflamatórios produzido por células da linhagem J774 após estímulo in vitro com a IL-33 e antígeno/parasito o Trypanosoma cruzi. [manuscrito] / Daniela Silva de Oliveira. - 2020. 90 f.: il.: color., gráf.. + Quadros.

Orientador: Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva.

Coorientadora: Dra. Luiza Oliveira Perucci.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Citocinas. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Células. I. Perucci, Luiza Oliveira . II. Silva, André Talvani Pedrosa da . III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.937

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6 1589

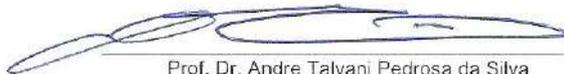


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
Biológicas



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 02 dias do mês de março do ano de 2020, às 09:30 horas, nas dependências do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (Iceb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Daniela Silva de Oliveira, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Dr. Andre Talvani Pedrosa da Silva (Presidente - UFOP), pela Profa. Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau (Membro - Externo), pelo Prof. Dr. Mauro Cesar Isoldi (Membro - UFOP) e pela Profa. Dra. Luiza Oliveira Perucci (Co-Orientadora - Externo). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Perfil de Mediadores Inflamatórios Produzido Por Células da Linhagem J774 Após Estímulo in Vitro com a II-33 e Antígeno/Parasito o Trypanosoma Cruzi", na área de concentração: Imunobiologia de Protozoários. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 45 minutos para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro Profa. Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau; segundo Prof. Dr. Mauro Cesar Isoldi; terceiro Profa. Dra. Luiza Oliveira Perucci; quarto Prof. Dr. Andre Talvani Pedrosa da Silva. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a mestranda foi aprovada, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela mestranda. Ouro Preto, 02 de março de 2020.



Prof. Dr. Andre Talvani Pedrosa da Silva

Presidente



Profa. Dra. Luiza Oliveira Perucci



Profa. Dra. Juliana de Assis Silva
Gomes Estanislau



Prof. Dr. Mauro Cesar Isoldi



Mestranda

*“Unless someone like you cares a whole awful lot,
Nothing is going to get better. It's not.”*

Dr. Seuss

AGRADECIMENTOS

A agência de fomento CAPES, pela concessão da bolsa de nº 88882.461689, ao CNPq e FAPEMIG, pelo investimento para a realização deste trabalho. Ao programa CBIOL e a UFOP pelo ensino de qualidade.

Aos laboratórios LBTM e de doença de Chagas, pela confiança para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador André Talvani, pelo carinho, paciência, ensinamentos, por me tranquilizar na hora do desespero e pela confiança ao longo destes 4 anos.

A minha co-orientadora Luiza, pela ajuda nas etapas do trabalho, pela paciência e pelo carinho.

Aos meus pais, Eliana e José, pelo amor, amizade, carinho, apoio e paciência ao longo desses 7 anos de estudo. Aos meus irmãos, Daisy e David, pelo amor, carinho, pela diversão, pelas risadas e conversas. Obrigada por serem tão presentes em minha vida. Amo todos vocês.

A Ana Luísa e Lud pela amizade, pelo carinho, pelas risadas e por toda ajuda neste trabalho.

A Ayla, pela amizade ao longo desses anos, por sempre me fazer rir, por estar comigo em todos os momentos, pelo carinho e conversas. É sempre uma aventura estar com você.

As meninas do BM resistência (Tamiles, Miriã, Taynara e Thays) pela amizade, pelo carinho, pelas conversas. Me divirto muito com todas vocês.

A Tamiles pela amizade e companheirismo desde sempre, pelas conversas, pela ajuda, pelo carinho, pela paciência e por sempre me ouvir.

A Raquel pela amizade desde a graduação, pelas conversas e pelo carinho.

A Miriã pela amizade, pela paciência, pelo carinho, obrigada por ter feito parte desta jornada.

A Débora e ao Guilherme pela companhia, pelas conversas e pelas risadas.

A toda equipe do Labiin pela ajuda, convivência e pelo carinho ao longo desses anos.

RESUMO

Na infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, citocinas de perfil inflamatório exercem importante papel na imunopatogênese, enquanto outras apresentam suas ações ainda incertas, como é o caso da interleucina (IL)-33. O objetivo deste estudo é avaliar o perfil de resposta inflamatória induzido por células de cultura estimuladas com a IL-33 e com o *T. cruzi* (parasito vivo e antígenos – Ags). Na etapa I, Ags obtidos de parasitos da cepa Y do *T. cruzi* em diferentes concentrações (0; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL) foram utilizados para estimular células da linhagem J774, após 24h, sendo o sobrenadante coletado para a dosagem do TNF (fator de necrose tumoral) por imunoensaio enzimático (ELISA). Assim, a dose selecionada foi a de 100µg para estimular as células. Na etapa II, realizou-se o cultivo de células J774 adicionando 5×10^5 células/poço para o estímulo com antígeno. Na etapa III foram plaqueadas cerca de $1,25 \times 10^5$ células/poço utilizando 1×10^6 formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* como estímulo. Os estímulos seguiram o seguinte padrão: (i) cultura sem IL-33 e sem antígeno/*T. cruzi*; (ii) cultura com IL-33 (10 ng/ml) e sem antígeno/*T. cruzi*; (iii) cultura sem IL-33 com antígeno (100µg/mL) e *T. cruzi*; (iv) cultura com IL-33 (10ng/ml) e com antígeno (100µg/mL) e *T. cruzi*. As culturas foram avaliadas em diferentes tempos após os estímulos, sendo eles 0h, 24h e 48h e os sobrenadantes coletados para dosagem dos mediadores inflamatórios: TNF, IL-17 (interleucina 17), CCL2 (ligante 2 da quimiocina do grupo CC), IL-10 (interleucina 10), dosagem de nitrito pelo método de Griess e contagem de amastigotas. Observou-se diferenças na produção do TNF, IL-17, CCL2 para os grupos estimulados pelo antígeno ou pelo *T. cruzi* nos tempos de 24h e 48h. Para a citocina IL-10, essas diferenças foram observadas apenas nos grupos estimulados com o *T. cruzi*. Em relação ao nitrito, observou-se diferenças nos grupos estimulados com Ag ou *T. cruzi* para os tempos 0h, 24h e 48h. O número de formas amastigotas foi maior nas células estimuladas com a citocina IL-33. De forma geral, tanto o antígeno quanto o *T. cruzi* vivo, induziu a produção de mediadores inflamatórios nas células J774 com 24h ou de 48h. A IL-33 mostrou-se importante nos eventos iniciais da infecção tanto em células estimuladas com o Ag quanto com o parasito vivo, bem como no controle da citocina IL-10 nos grupos infectados. Dessa forma, concluímos que a citocina IL-33 durante a infecção *in vitro* pelo *T. cruzi*, em cultura de células J774, participa na produção de mediadores inflamatórios e regulatórios.

Palavras Chave: IL-33; mediadores inflamatórios; *Trypanosoma cruzi*; células J774

ABSTRACT

In the *Trypanosoma cruzi* infection, the inflammatory cytokines play an important role in the immunopathogenesis, while other cytokines have their actions still uncertain, such as the IL-33. The aim of this study is to evaluate the inflammatory response profile induced by the cultured cells stimulated with IL-33 and *T. cruzi* (live parasites and total antigen - Ag). In step I, Ags obtained from *T. cruzi*, Y strain, in different concentrations (0; 12.5; 25; 50; 100 and 200 µg) was used to stimulate J774 cells after 24h. The culture supernatant was collected for the measurement of TNF (tumor necrosis factor) by enzyme immunoassay (ELISA) which was 100 µg of Ag. In step II, was plated 5×10^5 J774 cells/well (stimulated with Ag). In step III was plated as well as 1.25×10^5 J774 cells/well (stimulated with 1×10^6 metacyclic trypomastigote forms of the *T. cruzi*). The stimulus followed the following pattern: (i) culture without IL-33 and without Ag/ *T. cruzi*; (ii) culture with IL-33 (10 ng/ml) and without Ag/*T. cruzi*; (iii) culture without IL-33 with Ag (100 µg/mL) and *T. cruzi*; (iv) culture with IL-33 (10ng/ml) and with Ag (100µg/mL) and *T. cruzi*. The cultures were evaluated at different times after the stimulus in 0h, 24h and 48h and the supernatants collected for the measurement of the inflammatory mediators: TNF, IL-17 (interleukin 17), CCL2 (C-C motif chemokine ligand 2), IL-10 (interleukin 10) by ELISA; nitrite by the Griess method and amastigote count. Differences were observed in the production of TNF, IL-17, CCL2 for groups stimulated by the Ag or *T. cruzi* at 24h and 48h. For the IL-10, these differences were observed only in the groups stimulated with alive forms of *T. cruzi*. Regarding nitrite, differences were observed in the groups stimulated with Ag or *T. cruzi* at 0h, 24h and 48h. The number of amastigote forms was higher in those J774 cells stimulated with IL-33. In general, both Ag and the alive *T. cruzi* induced the production of inflammatory mediators in J774 cells at 24h and/or 48h. IL-33 was shown to be important in the initial events of infection in cells stimulated with Ag and with the alive parasite, as well as in the production of IL-10 by infected animals. We concluded that IL-33, during the *in vitro* J774 cells infection by *T. cruzi*, drives the production of inflammatory and regulatory mediators.

Key words: IL-33; inflammatory mediators; *Trypanosoma cruzi*; J774 cells

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Delineamento experimental da curva de antígeno. _____	35
Figura 2- Ilustração dos quadrantes de uma câmara de Neubauer (Adaptado da SPLABOR). _____	36
Figura 3- Delineamento experimental do processamento e estímulos das células com antígeno e com a forma tripomastigota metaciclíca do <i>T. cruzi</i> . _____	38
Figura 4- Curva de antígeno do <i>T. cruzi</i> (AgTc), cepa Y, em diferentes concentrações, administrado em cultura de células da linhagem J774. _____	41
Figura 5- Avaliação do mediador inflamatório TNF em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o <i>T. cruzi</i> (AgTc). _____	42
Figura 6- Avaliação do mediador inflamatório IL-17 em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o <i>T. cruzi</i> (AgTc). _____	43
Figura 7- Avaliação do mediador inflamatório CCL2 em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o <i>T. cruzi</i> (AgTc). _____	44
Figura 8- Avaliação do mediador inflamatório IL-10 em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o <i>T. cruzi</i> (AgTc). _____	45
Figura 9- Avaliação das concentrações de nitrito em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o <i>T. cruzi</i> (AgTc). _____	46
Figura 10- Avaliação do mediador inflamatório TNF em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o <i>T. cruzi</i> (parasito vivo). _____	47
Figura 11- Avaliação do mediador inflamatório IL-17 em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o <i>T. cruzi</i> (parasito vivo). _____	48
Figura 12- Avaliação do mediador inflamatório CCL2 em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o <i>T. cruzi</i> (parasito vivo). _____	49
Figura 13- Avaliação do mediador inflamatório IL-10 em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o <i>T. cruzi</i> (parasito vivo). _____	50

Figura 14- Avaliação das concentrações de nitrito em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o *T. cruzi* (parasito vivo). _____51

Figura 15- Quantidade de células infectadas nos grupos J774+*T. cruzi* e J774+*T. cruzi*+IL-33 nos tempos de 24h e de 48h. _____52

Figura 16- Quantidade de amastigotas em células infectadas nos grupos J774+*T. cruzi* e J774+*T. cruzi*+IL-33 nos tempos de 24h e de 48h. _____53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Mediadores inflamatórios. _____	17
Quadro 2- Moléculas de adesão. _____	21
Quadro 3- Dados de correlação de células infectadas e amastigotas com as citocinas TNF e IL-10. _____	54

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

APC's- Célula apresentadora de antígeno

ABTS- 2,2'-azino-di(3-etilbenzotiazolona ácido sulfônico)

BSA- Albumina de soro bovino

°C - Graus Celcius

CCL- Quimiocina

CXCL- Quimiocina

CLR- Receptor de lectina tipo C

CO₂ - Gás carbônico

Cz- Cruzipain

DAMP's- Padrões moleculares associados a danos

DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DVS27- Gene regulador de vasoespasma cerebral

DTU- *Discrete Typing Unit*

ELISA- Ensaio imunoenzimático

Fe-SODs- Superóxido dismutase contendo ferro

g- Força gravitacional

GMCSF- Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos

GPI- Glicosilfosfatidilinositol

ICAM-1- Molécula de adesão intercelular-1

IL- Interleucina

IL-1RAcP- Proteína acessória do receptor de interleucina 1

IFN- Interferon

IgE- Imunoglobulina do tipo E

Labiin- Laboratório de Imunobiologia da Inflamação

LFA-1- Antígeno associado a função linfocitária 1

LPS- Lipopolissacarídeo

MAPK- Proteína mitógena ativadora de quinases

Mac-1- Antígeno macrofágico 1

M-CSF- Fator estimulante de colônia de macrófagos

µg - Micrograma

µL - Microlitro

mL- Mililitro

MyD88- Fator de diferenciação mielóide 88

M2- Macrófago ativado alternativamente

NF-HEV- Fator nuclear das vênulas endoteliais altas

NFκB- Fator nuclear kappa b

ng- Nanograma

NK- *Natural Killer*

nm- Nanômetro

NO- Óxido nítrico

NRL- Receptor do tipo NOD

O₂- Oxigênio

PAMP's- Padrões moleculares associados a patógenos

PBS - Solução tampão fosfato

PBMC- Célula mononuclear do sangue periférico

PDGF- Fator de crescimento derivado de plaquetas

%- Porcentagem

RLR- Receptor tipo RIG-I

RNI's- Intermediários reativos de oxigênio

ROS- Espécies reativas de oxigênio

ST2- Receptor da supressão de tumorigenicidade 2

sST2- Receptor solúvel da supressão de tumorigenicidade 2

TcAPX- Hemoperoxidase dependente de ascorbato

TcMPX- *Tryparedoxin peroxidase mitochondrial*

TCD4⁺- Linfócito T do tipo CD4⁺

TCD8⁺- Linfócito T do tipo CD8⁺

TGF-β- Fator de transformação do crescimento beta

Th1- Resposta imune do tipo 1

Th2- Resposta imune do tipo 2

TLRs- Receptores do tipo Toll

TNF- Fator de necrose tumoral

UFOP- Universidade Federal de Ouro Preto

UV- Ultravioleta

VCAM-1- Molécula de adesão celular vascular

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
1.1 Sistema imunológico	15
1.2 Interleucina 33	24
1.2.1 Ação da interleucina-33 em resposta a infecções	25
1.3 Doença de Chagas	27
2.JUSTIFICATIVA	31
3.OBJETIVO	32
3.1 Objetivos específicos	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 IL-33 murina recombinante	33
4.2 Cultivo celular	33
4.3 Plaqueamento	33
4.4 Estímulo e processamento das células	34
4.5 Manutenção da cepa Y do <i>T. cruzi</i>	34
4.6 Produção de antígenos do <i>T. cruzi</i>	34
4.7 Curva de antígenos do <i>T. cruzi</i>	35
4.8 Obtenção das formas tripomastigotas metaciclícas do <i>T. cruzi</i>	35
4.9 Ensaio de infecção celular	36
4.10 Estímulo e processamento das células	36
4.11 Ensaio imunoenzimático (ELISA)	39
4.12 Dosagem de nitrito (Dosagem indireta de NO)	39
4.13 Contagem de células infectadas/amastigotas	40
4.14 Análise estatística	40
5.RESULTADOS	41

5.1 Dosagem de TNF para determinação da curva de antígeno.....	41
5.2 Produção de mediadores inflamatórios com estimulação antigênica.....	41
5.3 Avaliação da produção de nitrito com estimulação antigênica.....	45
5.4 Produção de mediadores inflamatórios com estimulação pelo <i>T. cruzi</i>.....	46
5.5 Avaliação da produção de nitrito com estimulação pelo <i>T. cruzi</i>.....	50
5.6 Avaliação da porcentagem de células infectadas/amastigotas pelo <i>T. cruzi</i>.....	51
5.7 Dados de correlação.....	53
6.DISSCUSSÃO.....	55
7.CONCLUSÃO.....	63
8. REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema imunológico

O sistema imunológico é formado por células e seus componentes que atuam em conjunto para proporcionar a defesa do organismo contra diversos tipos de injúrias (patogênicas e não patogênicas), o balanço entre componentes pró- e anti-inflamatórios e o reparo de tecidos comprometidos, restabelecendo a homeostase e o funcionamento adequado dos órgãos afetados (Cruvinel *et al.*, 2010). Esse sistema pode gerar dois tipos de resposta, a resposta imune inata, responsável por ser a primeira linha de defesa contra patógenos de amplo espectro, constituída por células como os leucócitos, as barreiras químicas e físicas, proteínas solúveis, moléculas bioativas (por exemplo, proteínas pertencentes ao sistema complemento) e a resposta imune adaptativa, uma resposta tardia porém mais específica e direcionada aos estímulos físicos/químicos ou biológicos como é o caso dos patógenos previamente citados, onde células como os linfócitos T e B (produção de anticorpos) atuam (Chaplin, 2010). Em ambas as respostas temos a participação de citocinas e quimiocinas, componentes que se diferem em função e local de produção e que contribuem também em outros processos do sistema imune citados anteriormente. (Berger, 2000; Cruvinel *et al.*, 2010; Parsadaniantz & Rosténe, 2008; Sinvagala & Sumanlatha, 2015).

As citocinas são glicoproteínas produzidas por células do sistema imunológico que desempenham funções de proliferação, estímulo ou regulação (Quadro 1). Quando produzidas, podem atuar de maneira parácrina, autócrina ou endócrina e, ao se ligar em seus receptores localizados na superfície das células, iniciam uma cascata de sinalização que culmina na produção de outras citocinas, na ativação ou morte celular ou mesmo na alteração do padrão de resposta celular. Além disso, as citocinas exibem o fenômeno de pleiotopia, no qual um gene é responsável por condicionar múltiplas características, ou seja, uma citocina é capaz de atuar em diversos tipos celulares, da mesma forma que diversas células são capazes de produzir a mesma citocina (Lin *et al.*, 2000; Foster, 2001; Zhang & Jianxiong, 2007; Dinarello, 2007).

É uma extensa família composta por aproximadamente 200 membros (Gualati *et al.*, 2016) ou mais, podendo ter ação pró-inflamatória (contribui para o processo da inflamação), como os interferons (IFN), o fator de necrose tumoral (TNF) e algumas interleucinas (Ex:IL-1, IL-12) ou anti-inflamatória (impede o desenvolvimento da inflamação) como por exemplo a IL-10 (Quadro 1). Entretanto, nem todas as citocinas

têm a sua ação definida, podendo em algumas situações exercer as duas ações dependendo da natureza dos estímulos ou dos fatores condicionantes (Monastero & Pentylala, 2017).

Já as quimiocinas, são proteínas de baixo peso molecular que promovem a migração de células (leucócitos) ao local inflamado, em resposta da produção de citocinas pró-inflamatórias, desde que possuam o ligante para a quimiocina produzida. São constituídas por uma estrutura de folha β central, hélice α terminal e uma extremidade N-terminal, sendo classificadas pelo número e presença de resíduos de cisteína próximo à extremidade N-terminal (Rollins, 1997). Atualmente dividida em 4 subfamílias CC, CXC, CX3C e XC, totalizando 50 componentes (Quadro 1) (Moser & Willimann, 2004; Ruffini *et al.*, 2007; Hughes & Nibbs, 2018).

Quadro 1- Mediadores inflamatórios

MEDIADORES INFLAMATÓRIOS			
CITOCINAS			
TIPO	CÉLULAS PRODUTORAS	FUNÇÃO	REFERÊNCIAS
IFN tipo I (- α ; - β)	Dendríticas e fagócitos mononucleares.	Atividade antiviral; aumenta o reconhecimento das células pelo antígeno; intensifica a citotoxicidade das células, aprimorando o seu papel efetor, e promove a diferenciação em células Th1(linfócitos T auxiliares).	Roitt <i>et al.</i> , 1999; Ferreira <i>et al.</i> ,2018.
IFN tipo II (- γ)	Linfócitos T e B, células <i>Natural Killer</i> (NK) e células apresentadoras de antígenos (APC's).	Aprimora a função efetora, levando ao desenvolvimento de espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (ON) e intermediários reativos de nitrogênio (RNIs); aumenta a apresentação de antígenos; estimula a diferenciação de linfócitos em células T efetoras (Th1 ou Th2); atua como estímulo para a eliminação de células cancerígenas, induz a produção de TNF por outros tipos celulares; auxilia na ativação de macrófagos.	Young,1996; Rothfuchs <i>et al.</i> , 2004; Schroder <i>et al.</i> ,2004.
IFN tipo III (- λ 1, - λ 2, - λ 3)	Células dendríticas plasmocitárias.	Atividade antiviral.	Coccia <i>et al.</i> , 2004; McNab <i>et al.</i> , 2015.
TNF (α ; β)	Macrófagicas/ monocíticas ativadas; células T, células NK, células endoteliais e fibroblastos.	Desencadeia respostas de morte celular (apoptose/necrose), através de seus receptores específicos (TNFR1, TNFR2, Faz, CD40); induz a produção e liberação de outras citocinas como : IL-1, IL-6,IL-12, IL-18,GM-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos), quimiocinas: CXCL1, IL-8, CCL2 (proteína quimioatraente de monócito), CXCL10; moléculas de adesão: E-selectina, ICAM-1 (molécula de adesão intercelular), VCAM-1(molécula de celular vascular); promove a diferenciação de monócitos, a proliferação de células T, a produção de anticorpos por células B e a ativação de células NK.	Tracey & Cerami,1994; Bradley, 2008; Wu & Hymowitz, 2010; Esposito & Cuzzocrea, 2011; Brotas <i>et al.</i> , 2012; Chu,2013; Kumar <i>et al.</i> , 2013; Lo <i>et al.</i> , 2014; Monaco <i>et al.</i> ,2015; Sedger & McDermott, 2014.
IL-1 β (IL-1)	Monócito, macrófago, neutrófilos, células dendríticas.	Induz a liberação de outras citocinas (TNF, IL-6); ativam células como os monócitos e macrófagos; maturação de células de Langerhans; diferenciação de macrófagos do tipo M1; auxiliam na proliferação de células B; induz respostas Th1.	Netea <i>et al.</i> , 2010; Bent <i>et al.</i> , 2018; Dinarello, 2018; Moorlag <i>et al.</i> , 2018.

MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

CITOCINAS

IL-2	Células T CD4 ⁺ ativas; células dendríticas; é expressa em CD8 ⁺ imaturas e células do timo.	Proliferação de células T; estimula a produção de células T efetoras e de memória; expansão de células NK; expansão e diferenciação de células LC2; limita as respostas da célula T.	Nelson <i>et al.</i> , 2004; Zelante <i>et al.</i> , 2012; Abbas <i>et al.</i> , 2018.
IL-6	Macrófagos, monócitos, estromais, hematopoiéticas, epiteliais e musculares.	Diferenciação de células B, em células produtoras de anticorpos; induz a produção de proteínas na fase inicial da infecção; diferenciação e proliferação de células não imunes; diferenciação de linfócitos T CD4 ⁺ imaturo; liberação durante lesão tecidual (não patogênica) como forma de aviso.	Tanaka <i>et al.</i> , 2014; Nassem <i>et al.</i> , 2016; Garbers <i>et al.</i> , 2018; Vainer <i>et al.</i> , 2018.
IL-15	Produzida por monócitos; expressa em macrófagos, células dendríticas, células não linfóides: da placenta, músculo esquelético e fibroblasto.	Homeostase de linfócito; ativação e proliferação de células T CD8 e células NK; aumenta a fagocitose de neutrófilos e macrófagos; induz a produção de GM-CSF em eosinófilos; atua como fator de crescimento em mastócitos; auxilia na proliferação e síntese de imunoglobulinas.	Saeed & Revell, 2001; Bannwart <i>et al.</i> , 2007; Waldmann, 2013; Robinson & Schluns, 2017;
IL-17	Linfócitos Th17.	Ativação de neutrófilos, promove a expressão de genes antimicrobicidas.	Gaffen, 2008; Cua & Tato, 2010; Normanton & Marti, 2013; Monin & Gaffen, 2018.
IL-22	Macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, células mielóides, células T αβ, células T γδ, células NKT e células linfóides.	Regeneração de tecidos epiteliais; proliferação e inibição da apoptose de células epiteliais; defesa contra infecções no intestino, mucosa, pele e pulmão.	Dudakov <i>et al.</i> , 2015; Zenewics, 2018.

MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

CITOCINAS

IL-4	Mastócitos, eosinófilos, basófilos, células T NK e ILC2.	Regulador da função de linfócitos e proteção contra apoptose; induz troca de classe da imunoglobulina para IgE; estimula diferenciação de células para o perfil Th2; inibe a diferenciação de células Th1; regula a proliferação, diferenciação e apoptose de mastócitos, células mielóides, dendríticas, endoteliais, musculares e neuronais.	Zamorono <i>et al.</i> , 2003; Luzina <i>et al.</i> , 2012; Gadani <i>et al.</i> , 2012; Juntilla, 2018.
IL-5	Células T CD4 ⁺ , células Th2.	Proliferação, diferenciação e maturação de eosinófilos; sinergiza com fatores quimiotáticos como a CCL11; diferenciação de células B ativadas, em produtoras de anticorpos	Kouro & Takatsu, 2009; Takatsu, 2011; Roufosse, 2018.
IL-13	Mastócitos, eosinófilos, basófilos, células T NK e ILC2.	Induz a produção de TGF- β , eotaxina-3, mucina; induz a expressão de integrinas e periostinas pelos fibroblastos; estimula a atividade contrátil de células bronquiais do músculo liso; auxilia na ativação de macrófagos alternativos; produção de muco no epitélio de vias aéreas.	Seyfizadeh <i>et al.</i> , 2015; Juntilla, 2018.

MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

QUIMIOCINAS

CCL2	Monócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, epiteliais, dentre outras.	Atua na migração de monócitos, linfócitos e células NK para o sítio inflamatório.	Deshmane <i>et al.</i> ,2009; Yoshimura, 2018.
CCL3	Macrófagos.	Quimiotaxia de monócitos e linfócitos, regula a proliferação de células hematopoiéticas/progenitoras.	Baba & Mukaida, 2014; Bhasvar <i>et al.</i> ,2014; Staversky <i>et al.</i> , 2018.
CCL4	Linfócitos T, neutrófilos, monócitos, células B; linfócitos Th1; células epiteliais, endoteliais e fibroblastos.	Quimiotaxia de leucócitos, células dendríticas, células NK : mobilização de cálcio nestas células e nas células do músculo liso e B progenitoras.	Wallace <i>et al.</i> , 2013; Cheng <i>et al.</i> ,2015; Chang & Chen, 2016.
CCL5	Expressa em linfócitos T, macrófagos, plaquetas, epitélio e fibroblatos.	Atua no recrutamento de leucócitos; juntamente com a IL-2 e o IFN- γ estimula a ativação e proliferação de células NK.	Lv <i>et al.</i> ,2013; Aldinucci & Colombatti, 2014.
CXCL1	Neutrófilos, mastócitos.	Migração de neutrófilos.	Palomino & Marti, 2015.
CXCL9	Monócitos, células endoteliais e fibroblastos.	Quimiotaxia de células Th1 ativadas e células NK; inibe proliferação de células endoteliais.	Gorbachev <i>et al.</i> ,2007; Tokunaga <i>et al.</i> ,2018.

Quadro 2- Moléculas de adesão

MOLÉCULAS DE ADESÃO			
TIPO	EXPRESSA EM CÉLULAS	FUNÇÃO	REFERÊNCIAS
ICAM-1	Leucócitos, células endoteliais e epiteliais etc.	Migração de leucócitos e adesão firme ao endotélio; migração transendotelial.	Ramos <i>et al.</i> , 2014; Vestweber, 2015.
VCAM-1	Células endoteliais.	Migração de leucócitos e adesão firme ao endotélio.	Kong <i>et al.</i> , 2018.
P-selectina	Células endoteliais e plaquetas.	Adesão de leucócitos; participa no rolamento de leucócitos.	McEver, 2015.
E-selectina	Células endoteliais.	Adesão de leucócitos; participa no rolamento de leucócitos.	McEver, 2015.
LFA-1	Leucócitos.	Adesão de células T.	Walling & Kim, 2018.
Mac-1	Leucócitos.	Adesão de leucócitos, migração, fagocitose, explosão respiratória, desgranulação.	Podolnikova <i>et al.</i> , 2016.

Os patógenos (bactérias, fungos, vírus, protozoários) podem atuar como potentes estímulos para a ativação da resposta imune. Entretanto, existem outros, como por exemplo os sinais endógenos liberados pelas células danificadas após lesão tecidual, culminando em uma resposta inflamatória. Resposta essa que tem a sintomatologia clínica de vermelhidão, calor, edema, perda da função da área afetada e dor. Este mecanismo envolve uma cascata de sinalização, dependente de mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, proteínas solúveis, lipídios entre outros) que tem por objetivo a eliminação dos referidos patógenos e restauração tecidual (Freire & Dyke, 2013; Chen *et al.*, 2017; Abdulkhaleq *et al.*, 2018).

Ressalta-se a importância das moléculas presentes na superfície destes patógenos durante seu reconhecimento pelo sistema imune, denominadas Pamp's (padrões moleculares associados a patógenos). Os Pamp's são reconhecidos por receptores presentes na superfície das células imunes, dentre os quais destacam-se os do tipo toll (TLRs) e os do tipo NOD (NRL) que reconhecem patógenos, células hospedeiras, fontes ambientais (amianto, sílica, alumínio) e células danificadas (Kim *et al.*, 2016). Os do tipo RIG-1 (RLR) que fazem o reconhecimento de vírus de RNA e aqueles de lectina do tipo C reconhecimento (CLR), que reconhecem glicanos e glicoproteínas presente na superfície de vírus, bactérias, fungos e parasitos. Os receptores se diferem em localização e em sinalização, mas apresentam as mesmas funções de reconhecimento, de induzir a produção de mediadores inflamatórios e de fagocitose (TLRs e CLR). Além disso os receptores também reconhecem os Damp's (padrões moleculares associados ao dano tecidual), que também promovem uma resposta inflamatória, porém não de origem infecto-parasitária (Kawai & Akira, 2010; Chen *et al.*, 2017; Amarante-Mendes *et al.*, 2018).

Por intermédio destes receptores, células do sistema imune como os macrófagos realizam esse reconhecimento e produzem citocinas como por exemplo o TNF, o IFN ou IL-12 (Quadro 1) que sinalizam para ocorrer o recrutamento de leucócitos, o qual é estimulado por quimiocinas produzidas no local da infecção (Cruvinel *et al.*, 2010). Neste recrutamento, os capilares se tornam permeáveis, o que permite a ocorrência da transmigração leucocitária. Durante uma resposta inflamatória, as células endoteliais são estimuladas a expressar moléculas de adesão como as selectinas P ou E, aumentando assim, a afinidade dos leucócitos circulantes pelo endotélio.

Os leucócitos se ligam a receptores específicos por meio de uma ligação fraca que pode ser rompida pelo fluxo sanguíneo, assim as células se movem até chegar ao local da infecção (Cruvinel *et al.*, 2010; Muller, 2013; Schnoor *et al.*, 2015; Gulati *et al.*, 2016).

Próximo a região da infecção, as integrinas presentes nos leucócitos exibem alta afinidade e se ligam ao seu receptor presente no endotélio (ICAM-1 ou VCAM-1) (Quadro 2). Neste momento, a célula se adere firmemente e realiza a diapedese (migração entre as células endoteliais). Ao chegar no local da infecção, os leucócitos são estimulados à eliminação do patógeno, que varia dependendo do tipo celular e do patógeno em questão, podendo ser pela fagocitose, pela ativação do sistema complemento ou pela ativação de receptores de morte (Cruvinel *et al.*, 2010; Muller, 2013; Schnoor *et al.*, 2015; Gulati *et al.*, 2016).

Os macrófagos presentes no local inflamado emitem pseudópodes (através do remodelamento da actina) que envolvem o organismo invasor formando o fagossomo. Com a posterior fusão ao lisossomo (responsável pela lise de partículas), tem-se o fagolisossomo, uma estrutura ácida composta por diversos tipos de enzimas hidrolíticas. Neste contexto ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio, de óxido nítrico e de outros componentes (catepsinas, proteases, lisozimas e lipases) para que haja eliminação do organismo invasor.

Ainda, para que a inflamação não se torne persistente, há a inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios e o estímulo para a produção de mediadores anti-inflamatórios (Cruvinel *et al.*, 2010; Rosales & Uribe Querol, 2017). Além disto, as células não fagocíticas retornam aos vasos sanguíneos ou linfáticos, as células fagocíticas apoptóticas são eliminadas pela eferocitose induzida por macrófagos alternativamente ativados, os quais produzem moléculas que estimulam a resolução do processo inflamatório como lipoxinas, resolvinas, maresinas, protectinas etc. A resolução da inflamação é finalizada com a cicatrização (Headland & Norling, 2015).

Como consequência da eliminação do patógeno, parte dos tecidos saudáveis são comprometidos e, portanto, tornam-se passíveis ao reparo tecidual. Os neutrófilos iniciam a formação de um tecido de granulação (rico em fibroblastos e vasos sanguíneos, depositados em uma matriz) que, ao longo dos dias, torna-se resistente devido a deposição de colágeno pelos fibroblastos. A partir deste momento, os macrófagos realizam a eliminação de detritos e sintetizam citocinas (TNF, IL-1) e fatores de crescimento (TGF- β , PDGF, collagenases, metaloproteinases da matriz), além de estimular fibroblastos,

queratinócitos e a angiogênese (contribui para formação de novos vasos). Como resultado final, temos a restauração tecidual (Emin *et al.*, 2009; Krafts, 2010).

Finalmente, dependendo do tipo de patógeno que penetra a circulação, a resposta mediada pelas células envolvidas pode, didaticamente, ser compreendida como “com perfil Th1”, aquela voltada a patógenos intracelulares ou “com perfil Th2”, voltada a alérgenos e helmintos. Em ambas as resposta haverá a produção de citocinas específicas e alguns dos fatores mencionados anteriormente. A resposta do tipo Th1 é caracterizada pela produção de citocinas como IFN, TNF, IL-1, IL-6, IL-12, dentre outras, já na resposta do tipo Th2 destacam-se a IL-4, IL-13 ou, mais recentemente a IL-33, dentre outras (Berger, 2000; Zhang & An, 2007).

1.2 Interleucina 33

A interleucina 33 (IL-33) é uma citocina classificada como um membro da família da IL-1 por possuir uma estrutura de hélice-volta-hélice ou trevo de três folhas. Seu sítio gênico está localizado no braço do cromossomo 9 em humanos e é constituído por 270 aminoácidos (Cayrol & Girard,2017; Shen *et al.*,2018). Foi identificada inicialmente como DVS27, um gene regulador de vasoespasm cerebral em cães em 1999 (Onda *et al.*,1999) e, em 2003, como o "fator nuclear das vênulas endoteliais altas" (NF-HEV) em humanos (Baekkevold *et al.*,2003). A IL-33 foi designada como um membro da família da IL-1 em 2005 (Schmitz *et al.*, 2005).

Esta citocina é produzida em situações de necrose, inflamação e lesão tecidual, onde desempenha o papel de citocina e de regulador transcricional (papel pouco elucidado atualmente) (Cayrol & Girard,2017). Pelo fato de não possuir uma via de sinalização para sua liberação, ela permanece no núcleo das células produtoras e é liberada ao meio extracelular em resposta ao dano. A IL-33 é secretada de forma ativa, sem que haja a clivagem pela caspase 1, etapa fundamental para outras citocinas da família IL-1. A IL-33 pode ser processada por proteases como catepsina G ou elastase que a tornam mais ativa e solúvel em circulação. A IL-33 se liga ao receptor ST2, membro da família de receptores do tipo Toll e ao receptor de IL-1 (IL-1RAcP) formando um complexo. A IL-33 também pode se ligar a forma solúvel do ST2 (sST2). O complexo IL-33/ST2/IL-1RAcP recruta Myd88, as quinases IRAK-1 e IRAK-4 e o TRAF6 e, dessa forma, ativa as vias de sinalização NFκB e MAPK, culminando na produção de mediadores inflamatórios. Além disso, a clivagem da IL-33 pelas caspases 3 e 7 inibe a sua atividade pró-inflamatória e ativa vias apoptóticas (Schmitz *et al.*, 2005; Chackerian *et al.*,2007;

Miller & Liew, 2011; Palmer *et al.*,2008; Cayrol & Girard,2017; Li *et al.*,2018; Shen *et al.*,2018).

Existem vários mecanismos de regulação de atividade da IL-33, como a sua ligação ao sST2, o qual inibe a sua atividade (Hayakawa *et al.*, 2007). Destaca-se também a sua regulação nuclear, pois uma vez que a citocina é produzida no núcleo, ela tende a ficar armazenada através da ligação do domínio N-terminal que contém um motivo de ligação a cromatina, impedindo a sua liberação e o desencadeamento de um processo inflamatório intenso (Carriere *et al.*, 2007; Moussion *et al.*,2008; Bessa *et al.*,2014; Cayrol & Girard, 2017). A ação da IL-33 também pode ser inibida por proteases, como mencionado anteriormente, através da clivagem pelas caspases 3 e 7, bem como pela caspase 1 (Cayrol & Girard,2009; Kim *et al.*,2015; Madouri *et al.*, 2015). Por fim, após a IL-33 ser liberada para o meio extracelular, ela pode ser oxidada em seus resíduos de cisteína e, em seguida, se ligar por pontes dissulfeto, o que leva a uma alteração conformacional, bloqueando, assim, a região de ligação ao receptor ST2 (Cohen *et al.*, 2015).

A IL-33 é produzida por células endoteliais (principais produtoras), epiteliais, neutrófilos, monócitos, fibroblastos, miofibroblastos e expressa em células de pele (endoteliais e epiteliais) e células do trato gastrointestinal (Cayrol & Girard,2017; Chan *et al.*, 2019). O seu receptor ST2 e assim como esta citocina, também é expressa em macrófagos, células dendríticas, mastócitos e células Th2 (Chen *et al.*,2017). Geralmente, é uma citocina envolvida na resposta do tipo Th2, de modo que ativa mastócitos, basófilos, células dendríticas, células NK, macrófagos alternativos (M2), células auxiliares naturais (ILC2s), células T e B (Miller, 2011; Moussion *et al.*, 2008; Kuchler *et al.*, 2008; Cayrol & Girard,2017).

1.2.1 Ação da interleucina-33 em resposta a infecções

Em determinadas situações, a IL-33 atua em uma resposta do tipo Th1 aumentando a produção de citocinas (IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13) (Smithgall *et al.*, 2008; Blom & Poulsen, 2012; Komai-Koma *et al.*, 2016), o fator estimulador de colônia de granulócito e macrófago (GMSF- MSF) (Smithgall *et al.*, 2008) e, combinada com a citocina IL-12, proporciona a diferenciação de células Th1 *in vitro* e *in vivo* (Komai-Koma *et al.*, 2016) e desencadeia a função efetora das células TCD8⁺ (Yang *et al.*, 2011).

Podemos destacar o aumento sérico da IL-33 e da expressão de seu receptor ST2, em quadros de hipersensibilidade ou alergias (asma, rinite, dermatites) (Sakashita *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012; Kojima *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014; Lei *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Mitchell *et al.*, 2018; Peng *et al.*, 2018), onde a superexpressão dessa citocina, como por exemplo na dermatite atópica, agravaria o quadro clínico em questão (Shimizu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2017). Estudos mostram que diante do bloqueio da IL-33 com anticorpos (Kim *et al.*, 2012; Lei *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2018) ou com o ST2 solúvel (Lee *et al.*, 2014) observa-se um efeito protetor local e redução do processo inflamatório.

Em outras situações, a IL-33 exibe função protetora, quando utilizada como tratamento em doenças cardiovasculares (Seki *et al.*, 2009) e na aterosclerose (Miller *et al.*, 2008) em modelo animal. Para doenças cardíacas autoimunes, sugere-se a utilização do seu receptor solúvel sST2 como o tratamento mais adequado (Abston *et al.*, 2012). Já em infecções helmínticas pelo *Trichuris muris* (Humphreys *et al.*, 2008), *Strongyloides venezuelensis* e *Nippostrongylus brasiliensis*, (Hung *et al.*, 2012; Yasuda *et al.*, 2012; Scalfone *et al.*, 2013) a citocina apresenta papel na eliminação destes nematódeos.

Em modelos de infecção por protozoários, pouco abordado na literatura, a resposta à IL-33 se difere. Em infecções por *Toxoplasma gondii* na ausência do receptor ST2 a resposta Th1 é exacerbada, desencadeando um quadro de encefalite (Jones *et al.*, 2010). Já em infecções por *Plasmodium berghei* utilizando a IL-33 como tratamento, ela foi capaz de inibir o desenvolvimento da malária cerebral, além de reduzir os níveis de mediadores inflamatórios na circulação (Besnard *et al.*, 2015). Sendo assim, a sua função é dependente do modelo a ser empregado.

Em infecções causadas por protozoários, de uma forma geral, há um aumento na produção de mediadores inflamatórios e a busca por um equilíbrio entre ambas as respostas (com perfis Th1 e Th2), sendo este equilíbrio associado à menor inflamação e menor dano ao hospedeiro. Neste contexto, parte das doenças associadas a infecções por protozoários surgem em decorrência deste desequilíbrio da resposta inflamatória. Um exemplo clássico desta situação ocorre com as manifestações clínicas decorrentes da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em seres humanos, com o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica, do megacolon ou mesmo do megaesôfago. Este parasito é o causador da doença de Chagas, doença diretamente associada ao padrão de resposta inflamatória gerada no hospedeiro mamífero.

1.3 Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, foi descoberta por Carlos Chagas em 1909 na cidade de Lassance no interior de Minas Gerais (Kropf *et al.*, 2000; Dias, 2001; Junior *et al.*, 2017). É uma doença predominante na América Latina, afetando cerca de 8 milhões de pessoas (OMS, 2017), e presente em outras áreas devido a processos de imigração, transfusão de sangue, doação de órgãos e via congênita, de modo que as três últimas, juntamente com via oral e acidentes laboratoriais, são formas de infecção independentes do vetor (Dias & Schofield, 1999; Schmunis, 2007; Gontijo & Santos, 2009).

Como anteriormente mencionado, a doença tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, protozoário hemoflagelado, com ciclo de vida heteroxênico, intracelular obrigatório, pertencente a ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae (Chagas, 1909). Atualmente existem 7 grupos de *T. cruzi* classificados com base na sua DTU (discrete typing unit): Tc - I a -VI e Tcbat (Tibayrenc, 1998 apud Zingales *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2017).

O processo de infecção se inicia através da picada do inseto vetor, o triatomíneo da família Reduviidae (Brener *et al.*, 1987), tanto no ciclo doméstico quanto no ciclo silvestre. Essa é a segunda forma mais importante de infecção atualmente, sendo a transmissão oral de maior destaque (72% dos casos), que surge através do consumo de açaí e caldo de cana contendo o inseto moído ou suas fezes que abrigam a forma tripomastigota metaciclíca (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Durante o processo de repasto sanguíneo do inseto vetor, as formas tripomastigotas metaciclícas localizadas em sua ampola retal são excretadas juntamente com as fezes e penetram na circulação pela ferida ou escoriação. Nesse momento, o parasito se comunica com as células do sistema fagocítico mononuclear através da interação entre proteínas presentes na sua superfície como a GPI-mucinas (Glicosilfosfatidilinositol- GPI) e os receptores presentes na superfície das células, por exemplo o receptor do tipo Toll. Essa ligação antígeno-receptor resulta na internalização do *T. cruzi* (formação do vacúolo parasitóforo) (Rottenberg & Orn, 1998; Teixeira *et al.*, 2002; Brener *et al.*, 2000; Rassi *et al.*, 2010; De Pablos & Osuna, 2012), e devido a presença de enzimas, como por exemplo, as Fe-SODs (superóxido dismutases contendo ferro), TcMPX (tryparedoxin peroxidase mitocondrial), TcAPX (hemoperoxidase dependente de ascorbato) o parasito se protege de espécies reativas de oxigênio e

nitrogênio (Piacenza *et al.*, 2008). Dessa forma, ele é capaz de evadir o sistema imune, migrar para o citoplasma e iniciar o seu processo de replicação dentro da célula.

Após a fagocitose pelas células mononucleares, o parasito inicia o seu processo de diferenciação na forma amastigota culminando na replicação no citoplasma da célula por divisão binária. Após sucessivas divisões, a forma amastigota externaliza seu flagelo, diferenciando-se em tripomastigota sanguíneo e a célula hospedeira se rompe liberando as formas tripomastigotas na corrente sanguínea para infectar outras células. O ciclo silvestre deste parasito se reinicia quando um triatomíneo faz um novo repasto sanguíneo (Rottenberg & Orn, 1998; Brener *et al.*, 2000; Rassi *et al.*, 2010).

O momento inicial da infecção ou fase aguda tem a duração de 4 a 8 semanas e é caracterizado pela presença das formas tripomastigotas sanguíneas (parasitemia patente) no exame de sangue a fresco (Chagas, 1909), além de ausência de processos de fibrose tecidual nos sítios de acometimento deste parasito (Rassi *et al.*, 2010). Essa fase geralmente é assintomática, entretanto alguns indivíduos podem apresentar sintomas/sinais inespecíficos que surgem na 1^a ou 2^a semana pós infecção como febre, mal-estar, hepato/esplenomegalia e linfadenomegalia. Estes sintomas/sinais clínicos podem ser confundidos com outras condições clínicas, o que acaba impedindo o diagnóstico precoce. Em alguns casos, há o desenvolvimento de meningoencefalite e miocardite podendo levar ao óbito (Rassi *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2006; Shyamapada, 2014). Além desses sintomas, também pode ser observado o chagoma de inoculação, uma lesão cutânea saliente e arredondada que surge no local em que onde o parasito penetrou (Mazza & Freire, 1940; Coura & Pereira, 2010; Teixeira *et al.*, 2006) e o sinal de Romaña, edema palpebral unilateral (Romaña, 1935), ambos sinais característicos de porta de entrada do parasito.

O controle do parasitismo exercido pelo sistema imune é essencial neste momento para definir o curso da doença. Inicialmente, os macrófagos e as células dendríticas, ativadas após a invasão do *T. cruzi*, apresentam seus antígenos às células T, culminando na produção da citocina IL-12. Esta citocina é capaz de estimular as células NK a produzir IFN- γ que potencializa a produção de TNF e IL-12 (Boscardin *et al.*, 2010; Talvani & Teixeira, 2011; Cardillo *et al.*, 2015). Dessa forma, ocorre um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, responsáveis pela eliminação do parasito (Muñoz-Fernandez *et al.*, 1992; Vespa *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1995; Talvani & Teixeira, 2011).

As células T (CD4⁺ e CD8⁺) participam do processo inflamatório através da produção de citocinas. As células T CD4⁺ produzem IFN, TNF, IL-21, IL-17, IL-2, IL-10, etc, enquanto as T CD8⁺ produzem o IFN, TNF e a IL-2, (Acevedo *et al.*,2018). Além disso, as células T CD8⁺ auxiliam na erradicação do parasito pela produção de granzima, perforina B ou granulicina (Boscardin *et al.*, 2010; Acevedo *et al.*,2018). E ao mesmo tempo em que uma resposta pró-inflamatória se desenvolve, citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, o TGF- β , a IL-22, são produzidas pelo hospedeiro na tentativa de atenuar o processo inflamatório e os danos teciduais (Boscardin *et al.*, 2010; Talvani & Teixeira, 2011).

Contudo, mesmo que haja um controle inicial da infecção, a maioria dos indivíduos infectados evolui para a fase crônica da doença. A fase crônica é caracterizada pela parasitemia sub-patente e se apresenta, principalmente, sob a forma indeterminada (assintomática) que corresponde a maior parte da população afetada (50% a 60% dos casos). Entretanto, por motivos ainda não elucidados, alguns indivíduos desenvolvem a forma sintomática (Pereira & Navarro, 2013).

Esta forma é caracterizada por manifestações clínicas variadas no coração (94,5% dos casos), como por exemplo, a cardiomiopatia chagásica crônica, em que ocorrem alterações no sistema de condução do impulso elétrico (arritmias), insuficiência cardíaca, aumento e rigidez do miocárdio. Essas manifestações ocorrem devido ao processo inflamatório, morte celular e remodelamento cardíaco (fibrose). O sistema gastrointestinal também pode ser acometido em apenas 4,5% da população infectada. Neste caso, ocorre o desenvolvimento dos “megs”: megacolon (fezes endurecidas, constipação, dilatação e espessamento da parede do cólon) e megaesôfago (regurgitação, salivação, azia, disfagia) (Prata, 1999; Prata, 2001; Texeira *et al.*,2006; Texeira *et al.*, 2006; Marin-Neto *et al.*,2007).

Na fase crônica da doença de Chagas, a população celular dominante são os linfócitos T CD8⁺ e, à medida que a doença avança, a população de células T CD8⁺ de memória central se torna mais frequente (Bustamante *et al.*,2008). Geralmente os antígenos de *T. cruzi* são os alvos destes tipos celulares e são específicos para determinados epítomos, dentre eles as transialidades (Martin *et al.*, 2006). Ainda, o número dessas células pode ser elevar durante a infecção devido à estimulação antigênica constante, porém a sua atividade efetora é prejudicada (Leavey & Tarleton, 2003).

Diante do exposto, os estudos envolvendo a resposta imune em diferentes modelos da infecção pelo *T. cruzi* têm crescido a cada década e propiciado a estruturação de redes

de conexão entre a infecção, a resposta imune e os quadros clínicos associados. No presente estudo, trouxemos à tona a participação da IL-33 no contexto da infecção pelo *T. cruzi*, mas poucos estudos até o momento abordaram o papel real desta citocina nesta infecção. Sabe-se, no entanto, que indivíduos com a forma indeterminada e cardíaca da doença de Chagas expressam a IL-33 em diferentes tipos de células (neutrófilos, monócitos clássicos, monócitos inflamatórios e monócitos), porém sem diferenças entre elas (Medeiros *et al.*, 2019). Por essa razão, é fato que a IL-33 atua no processo da resposta inflamatória contra o parasito, mas pouca informação sobre seu papel é descrito até momento.

2. JUSTIFICATIVA

O papel da interleucina-33 na linha de defesa contra patógenos *in vivo* ainda é controverso e pouco conhecido. Os relatos até o presente momento indicam a sua eficiente função em uma resposta voltada a alérgenos e infecções helmínticas, além da sua atuação em outros tipos de doenças como as cardiovasculares envolvidas com aterosclerose e até mesmo na doença cardíaca imune. A sua ação como uma citocina Th2 efetora em helmintoses é bem definida pela literatura, entretanto o mesmo não é observado para protozoários. Devido à presença do parasito e a sua disseminação no organismo, o sistema imune é ativado, mas a exacerbação do processo inflamatório culmina em lesão tecidual. A IL-33 atua como citocina protetora em infecções pelo *Toxoplasma gondii* (Jones *et al.*, 2010), pelo *Plasmodium berghei* (Besnard *et al.*, 2015) e já foi descrito estar expressa em células circulantes de pacientes com as formas crônicas indeterminada e cardíaca da infecção pelo *T. cruzi*. Por isso, a IL-33 parece exercer um papel neste contexto da resposta imune contra o *T. cruzi*, porém ainda não descrito em modelos *in vitro* e *in vivo*.

3. OBJETIVO

Identificar a ação da IL-33 em células da linhagem J774 (*in vitro*) após estímulos com *T. cruzi* na produção de mediadores inflamatórios solúveis.

3.1 Objetivos específicos

Em culturas de células J774, estimuladas com a IL-33 em presença de antígenos da cepa Y do *T. cruzi* e com o parasito vivo, avaliar:

- A produção de mediadores inflamatórios com perfil Th1 e Th2 (TNF, IL-17, IL-10, CCL2);
- A produção de óxido nítrico (nitrito);
- A porcentagem de células infectadas pelo parasito.

4.MATERIAIS E MÉTODOS

As células da linhagem J774 (macrófago derivado de sarcoma do retículo de camundongo da linhagem BALB/c) foram mantidas no banco de nitrogênio do Laboratório de Imunobiologia da Inflamação (Labiin) localizado na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Todos os materiais utilizados durante os procedimentos foram previamente autoclavados e o experimento realizado em um ambiente estéril em cabine de segurança biológica tipo II.

4.1 IL-33 murina recombinante

A IL-33 foi adquirida pela Peprotech-Brasil-Funpec (proteína de 17,5 kDa contendo 158 resíduos de aminoácidos, nº do catálogo 210-33, com 98% de pureza). Para cada poço estimulado foi adicionado 10 ng/mL da proteína (Rank *et al.*,2009; Yang *et al.*,2011).

4.2 Cultivo celular

As células da linhagem J774 foram mantidas em garrafas de 25 mL e 75 mL (Kasvi) utilizando o meio DMEM, suplementado com 10% soro bovino fetal, gamicina, glutamina. As passagens celulares (repiques) foram realizadas conforme a confluência das células (1 passagem por garrafa). As garrafas foram mantidas a 37°C em estufa de 5% de CO₂.

4.3 Plaqueamento

Após o cultivo celular, as células foram centrifugadas (*Eppendorf*) utilizando uma rotação de 1100 g à 4°C durante 10 min. Após, o meio de cultura foi descartado e o *pellet* ressuspendido. Desse conteúdo, foi retirada uma alíquota de 10 µL para realizar a contagem das células em câmara de Neubauer (*Bright-Line, New-Optics*).

A contagem foi realizada contando os 4 quadrantes da seguinte forma.

$$N \text{ de células} = \frac{n \text{ total de células} \times 1 \times 10.000}{n \text{ de quadrantes contados (4)}}$$

Fonte: BMM 5777 – Culturas celulares e suas aplicações em Microbiologia

Dessa forma, dependendo da quantidade de células encontradas, foi adicionada uma maior ou menor quantidade de meio DMEM 10% para diluição. Após a contagem, foi feito o plaqueamento (5×10^5 células/poço) utilizando placa de 24 poços (Kasvi), em triplicata sendo as placas mantidas à 37°C em estufa de 5% de CO₂.

4.4 Estímulo e processamento das células

Os estímulos das células J774, em cultura, seguiram o seguinte padrão: (i) cultura sem IL-33 e sem antígeno; (ii) cultura com IL-33 (10 ng/mL) e sem antígeno; (iii) cultura sem IL-33 e com antígeno (100 µg/mL); (iiii) cultura com IL-33 (10 ng/mL) e com antígeno (100 µg/mL) (Figura 3). As culturas foram avaliadas em diferentes tempos após os estímulos, sendo eles 0h, 24h e 48h. Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados e armazenados em freezer -80°C após cada um dos tempos.

4.5 Manutenção da cepa Y do *T. cruzi*

As formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi* (DTU II) (Neto, Campos & Higaki, 1974; Zingales *et al.*, 2009) foram mantidas em tubos falcon (15 mL e 50 mL) utilizando o meio LIT (Castellani *et al.*, 1967), dentro de uma estufa incubadora (BOD) a 25°C, durante todo o processo de cultivo. A manutenção foi realizada semanalmente e o repique feito de acordo com as condições do parasito para obtenção de um maior volume (expansão).

4.6 Produção de antígenos do *T. cruzi*

Para a produção dos antígenos foi realizada a expansão da cultura de formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. Os repiques do parasito foram realizados em garrafas de cultivo estéreis e, após a obtenção de uma cultura rica considerável, o conteúdo foi acondicionado em tubos falcon e centrifugado nas seguintes rotações: a 3500 g, 4°C durante 30 min (*pellet* ressuspensão em 10 mL de PBS1x estéril); a 3500 g, 4°C durante 15 min; a 3500 g (*pellet* ressuspensão em 10 mL de PBS1x estéril) e a 3500 g 4°C durante 15 min (*pellet* ressuspensão em 1 mL de PBS1x estéril). O conteúdo final foi transferido para tubos cônicos da marca *ependorff* e, novamente, centrifugados a 10000 rpm, 4°C durante 10 min (protocolo utilizado no Laboratório de doença de Chagas da UFOP). A massa foi mensurada de acordo com o método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

4.7 Curva de antígenos do *T. cruzi*

Para a determinação da melhor dosagem de antígeno foi realizada uma curva com uma variação de: 0; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg (Tadokoro & Abrahamsohn,2011).

Para esse procedimento, utilizou-se uma placa de 24 poços (Kasvi) onde foram plaqueadas 5×10^5 células da linhagem J774 (Stempin *et al.*,2002). Logo após 24h de plaqueamento, houve a troca do meio de cultivo e adicionou-se o antígeno nas respectivas concentrações. Novamente, após 24h, foi efetuada a coleta do sobrenadante e armazenado em freezer a -80°C .

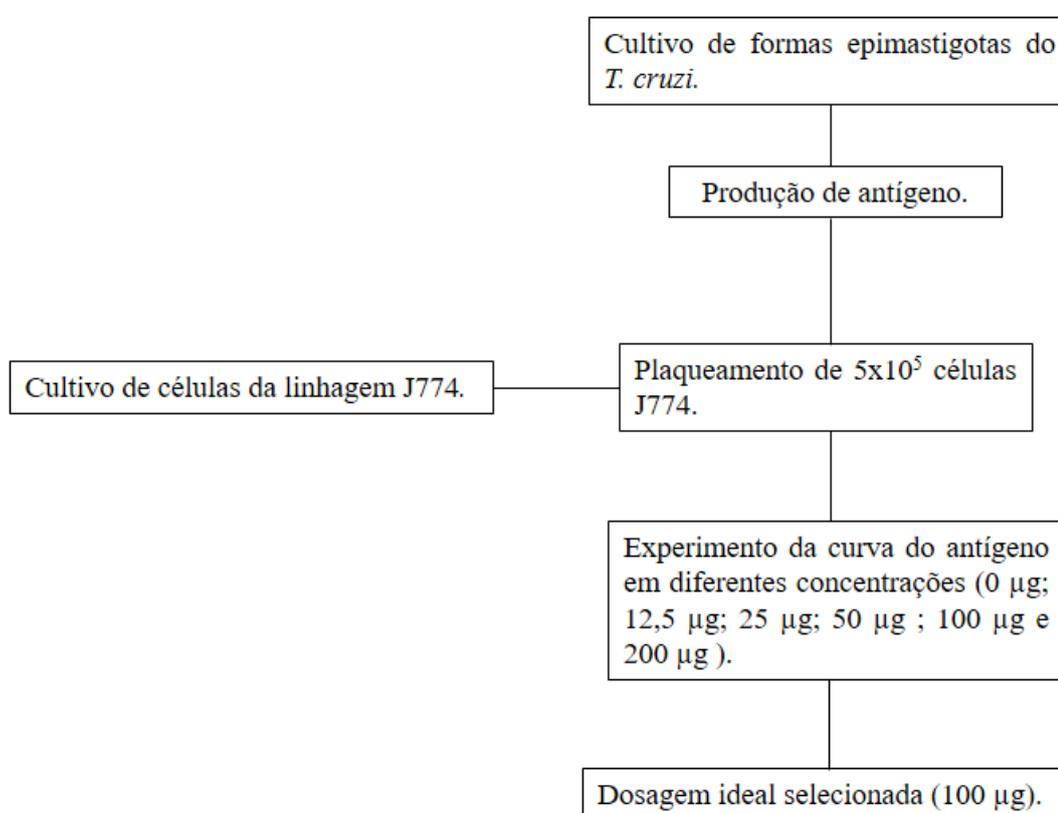


Figura 1- Delineamento experimental da curva de antígeno.

4.8 Obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*

Após o processo de expansão da forma epimastigota da cepa Y, foi obtida a forma tripomastigota metacíclica utilizando um meio de diferenciação para o parasito. Em uma garrafa de cultivo celular 75 mL (Kasvi), foram adicionados 5 mL de meio Grace (Grace, 1962) (*Sigma-Aldrich*) e 5 mL de cultura do parasito. O processo de diferenciação ocorreu

em 10 a 12 dias. Posteriormente, as formas recém-diferenciadas foram utilizadas no ensaio de infecção com as células J774.

4.9 Ensaio de infecção celular

As células J774 foram contadas utilizando a câmara de Neubauer (*Bright-Line, New-Optics*) e adicionadas $1,25 \times 10^5$ células/poço em uma placa de 24 poços da Kasvi (Stempin *et al.*, 2002). Em cada poço foi adicionado uma lamínula de vidro para adesão celular, sendo possível posteriormente a contagem de formas amastigotas após a coloração com Giemsa. Após 24 h, o meio DMEM (suplementado com 10% soro bovino fetal) de toda a placa foi trocado e adicionado um novo.

Para o plaqueamento dos parasitos, realizou-se a contagem em câmara de Neubauer (*Bright-Line, New-Optics*), sendo os parasitos contabilizados no quadrante central da lâmina, como mostrado na figura 2.

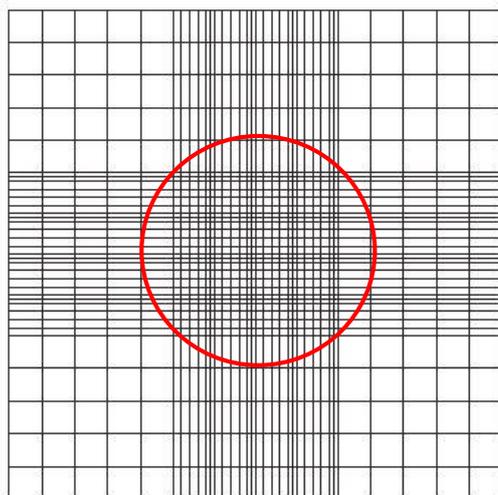


Figura 2- Ilustração dos quadrantes de uma câmara de Neubauer (Adaptado da SPLABOR)

4.10 Estímulo e processamento das células

Posteriormente à contagem, 1×10^6 de formas tripomastigotas metaciclícas da cepa Y foram plaqueadas (Stempin *et al.*, 2002), seguindo a subdivisão dos grupos: (i) cultura sem IL-33 e sem *T. cruzi*; (ii) cultura com IL-33 (10 ng/mL) e sem *T. cruzi*; (iii) cultura sem IL-33 com *T. cruzi*; (iiii) cultura com IL-33 (10 ng/mL) e com *T. cruzi* (Figura 3). O plaqueamento foi realizado em triplicata e as placas mantidas a 37°C em estufa de 5% de CO₂. As culturas foram avaliadas em diferentes tempos após os estímulos, sendo eles 0h,

24h e 48h. Os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados em freezer - 80°C após cada um desses tempos.

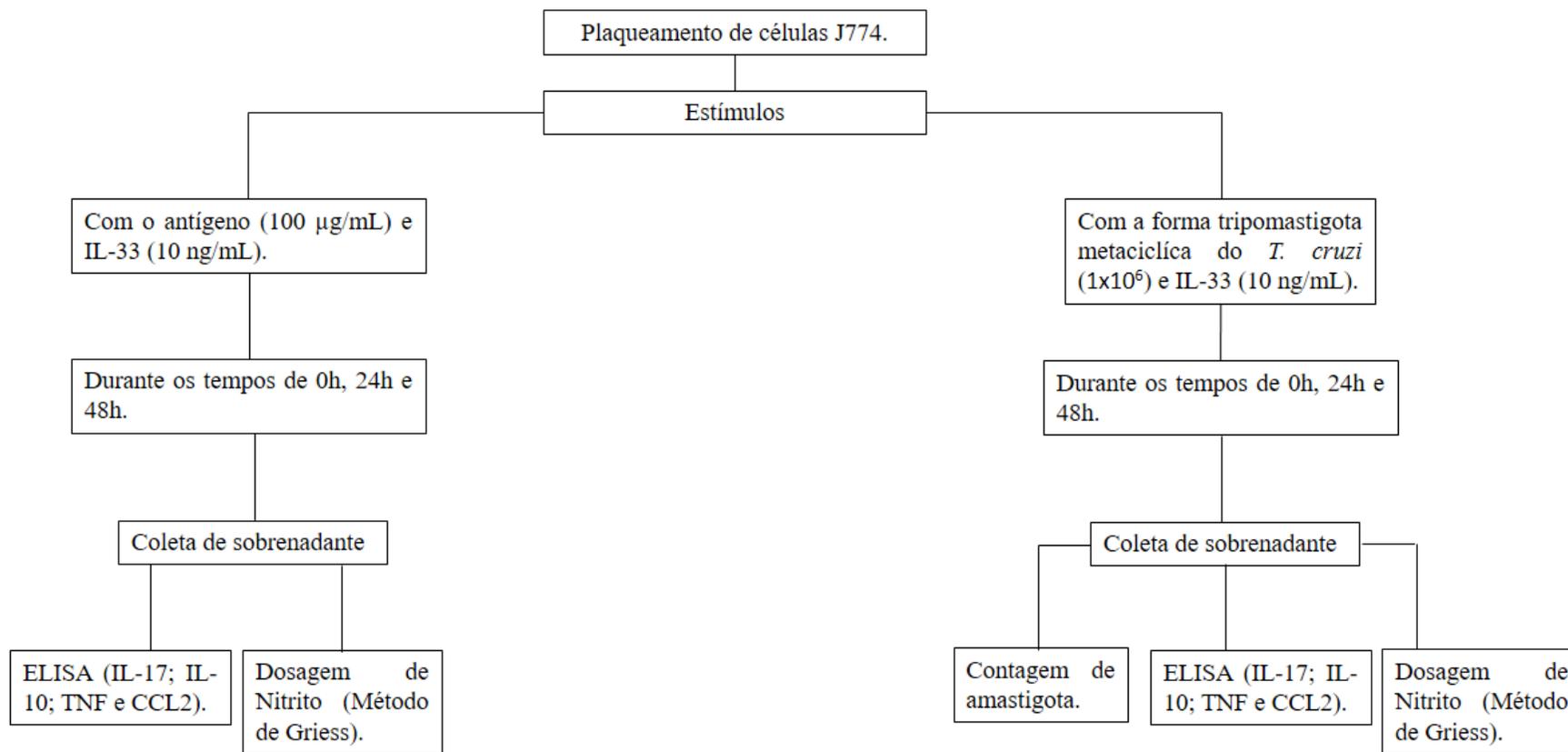


Figura 3- Delineamento experimental do processamento e estímulos das células com o antígeno e com a forma tripomastigota metaciclíca do *T. cruzi*.

4.11 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

As citocinas foram mensuradas em todos os grupos mencionados anteriormente utilizando o ensaio imunoenzimático (ELISA). As dosagens foram realizadas nos sobrenadantes das culturas e os seguintes mediadores inflamatórios avaliados: TNF, CCL2, IL-17, IL-10. Os ensaios foram realizados em triplicata em microplacas de 96 poços, de alta sensibilidade (Kasvi). Inicialmente, adicionou-se 100µL de anticorpo de captura por poço, o qual foi anteriormente diluído em uma solução de PBS 1x (0.1% de albumina de soro bovino BSA- SIGMA). As placas foram incubadas durante 12h à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas com uma solução contendo 0.05% *Tween-20* em PBS 1x para desprezar os anticorpos não aderidos. Posteriormente, adicionou-se 300µL da solução de bloqueio (1% BSA em PBS 1x) por poço e as placas foram incubadas por 1h à temperatura ambiente. Enquanto isso, as proteínas de interesse foram diluídas em diferentes concentrações para a obtenção das curvas-padrão, de acordo com o protocolo do fabricante (*PEPROTECH*). Logo após o tempo de incubação, as placas foram lavadas novamente e 100µL de sobrenadante de célula ou padrão foi adicionado nos respectivos poços da placa que ficou incubada no tempo de 2h em temperatura ambiente. Logo após o tempo de incubação, as placas foram lavadas e adicionado 100µL/poço do anticorpo de detecção diluído em 0.05% *Tween-20*, 0.1% BSA em PBS, e mantidas por 2h a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas e adicionou-se 100µL/poço de estreptavidina previamente diluída em 0.05% *Tween-20*, 0.1% BSA em PBS. Após 30 min de incubação, lavou-se as placas e adicionou-se 100µL/poço do substrato ABTS (2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolona ácido sulfônico). As placas foram incubadas na ausência de luz e foi monitorado o desenvolvimento de cor nos poços em intervalos de 5 min. A leitura das placas foi realizada em dois comprimentos de onda (405nm e 630nm) utilizando um leitor de ELISA (BioTek).

4.12 Dosagem de Nitrito (dosagem indireta de NO)

A dosagem de óxido nítrico foi feita utilizando o método de Griess (Green *et al.*, 1982) e realizada em triplicata. A solução de Griess foi constituída pela sulfanilamida 1% em H₃PO₄ 2,5% adicionada ao dicloreto de N (1-naftil) etilenodiamina 0,1% em H₃PO₄ 2,5%. Utilizou-se microplacas de 96 poços (Kasvi), onde foram utilizados 7 poços para o padrão (nitrito) e 2 para o branco (DMEM). Para os poços padrão, foram adicionados 50µL do meio DMEM e no primeiro ponto 50µL da solução de nitrito de sódio, no qual

foi realizado uma diluição seriada. Para os dois poços brancos, adicionou-se 50µL de DMEM. Nos poços restantes, foram adicionados 50µL de sobrenadante de célula e 100µL da solução de Griess. A placa foi incubada em ausência de luz durante 10 min. Após este tempo, foi feita a leitura em 542nm no espectrofotômetro (BioTek) utilizando o programa Softmax.

4.13 Contagem de células infectadas/amastigotas

Para a contagem de células, a lamínula dentro do seu respectivo poço foi fixada com metanol (1 mL) durante 5 min. Após a fixação, seguiu-se a etapa de coloração realizada com o Giemsa, o qual foi diluído em água destilada na proporção de 1:3. Após 10 min de coloração, as lamínulas foram lavadas em água destilada para remover o excesso do corante e postas para secagem. Em seguida, a lamínula foi colada com Entellan em uma lâmina para microscopia e após a secagem seguiu-se a contagem. Utilizando um microscópio óptico (Nikon), contou-se 100 células e destas 100 células a quantidade de células infectadas e quantidade de amastigotas que havia dentro destas células.

4.14 Análise estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o software *GraphPad Prism* versão 6.01. Os dados foram analisados pelo teste de normalidade (*Kolmogorov-Smirnov*). Para a comparação entre os grupos, quando necessário, foram feitas análises paramétricas utilizando o teste *One-Way Anova* e para análises não paramétricas foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis*. Para a comparação entre dois grupos utilizou o teste *T Student* para amostras pareadas. E para as análises de correlação foi utilizado o teste de *Pearson* para dados paramétricos e *Spearman* para dados não paramétricos. As diferenças significativas foram estabelecidas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Dosagem de TNF para determinação da curva de antígeno

Reconhecendo o TNF como uma das mais importantes citocinas produzidas mediante estimulação com antígenos de superfície do *T. cruzi*, optou-se pela sua dosagem para o estabelecimento da curva do antígeno oriundo das formas epimastigotas do *T. cruzi* (Boscardin *et al.*, 2010; Talvani & Teixeira, 2011; Cardillo *et al.*, 2015). Assim, observou-se diferença no padrão desta citocina no grupo que continha o antígeno de 100 µg/mL e 200 µg/mL em relação ao grupo controle (Figura 4). Com isso, estabeleceu-se que a dose ideal para estimulação das células da linhagem J774 seria de 100 µg/mL.

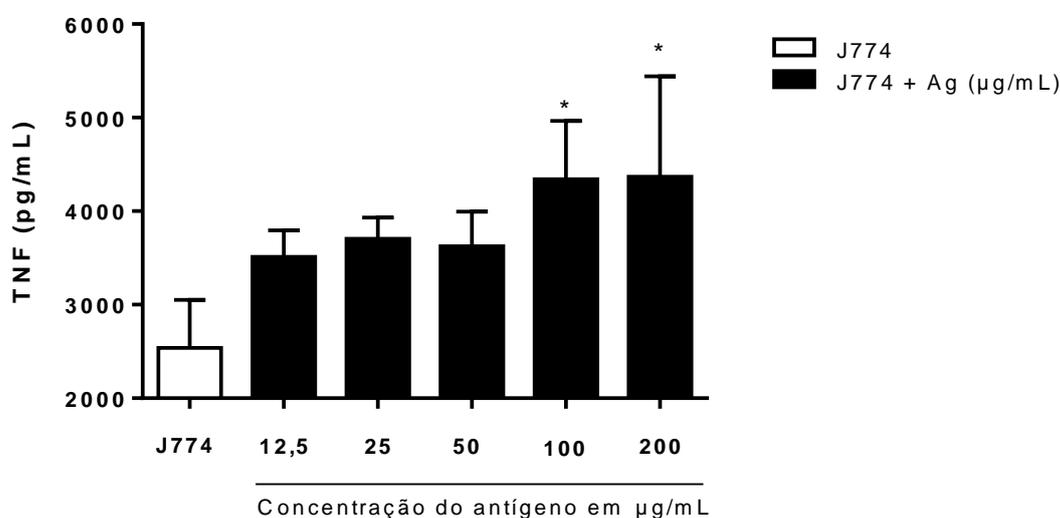


Figura 4- Curva de antígeno do *T. cruzi* (AgTc), cepa Y, em diferentes concentrações, administrado em cultura de células da linhagem J774. Dosagem de TNF (ng/mL) em sobrenadante celular, avaliado pelo ELISA, para os grupos: J774; J774 + *T. cruzi* AgTc (12,5 µg/mL); J774 + *T. cruzi* AgTc (25 µg/mL); J774 + *T. cruzi* AgTc (50 µg/mL); J774 + *T. cruzi* AgTc (100 µg/mL); J774 + *T. cruzi* AgTc (200 µg/mL). * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle.

5.2 Produção de mediadores inflamatórios com estimulação antigênica

Ao avaliar a produção de mediadores inflamatórios em sobrenadante de cultura celular nos diferentes tempos (0, 24 e 48h), observou-se diferenças para as citocinas inflamatórias TNF (Figura 5), IL-17 (Figura 6) e para a quimiocina CCL2 (Figura 7). Enquanto para a citocina regulatória IL-10, não houve diferenças estatísticas entre os grupos e entre os diferentes tempos (Figura 8).

Na citocina TNF (Figura 5) as diferenças estão presentes nos grupos: J774+*T. cruzi* (AgTc) e no J774+ *T. cruzi*(AgTc)+IL-33, onde houve um aumento desta citocina em relação ao grupo J774 (*) e ao grupo J774+IL-33 (&), em um tempo de 24h. Já no tempo de 48h esse aumento também é observado nos grupos: J774+IL-33, em relação ao grupo J774 (*), nos grupos J774+*T. cruzi*(AgTc) e no J774+*T. cruzi*(AgTc)+IL-33 em relação ao grupo J774 (*) e ao grupo J774+IL-33 (&).

Além disto foram identificada diferenças nos grupos J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi* (AgTc) em relação aos diferentes tempos, onde observou-se aumento desta citocina no tempo de 24h (#) em relação ao tempo 0h e em todos os grupos em 48h em relação ao tempo 0 (#). Ainda para os grupos J774+IL-33 e J774+*T. cruzi*(AgTc) este aumento é mais expressivo no tempo de 48h em relação aos mesmos grupos no tempo de 24h (+).

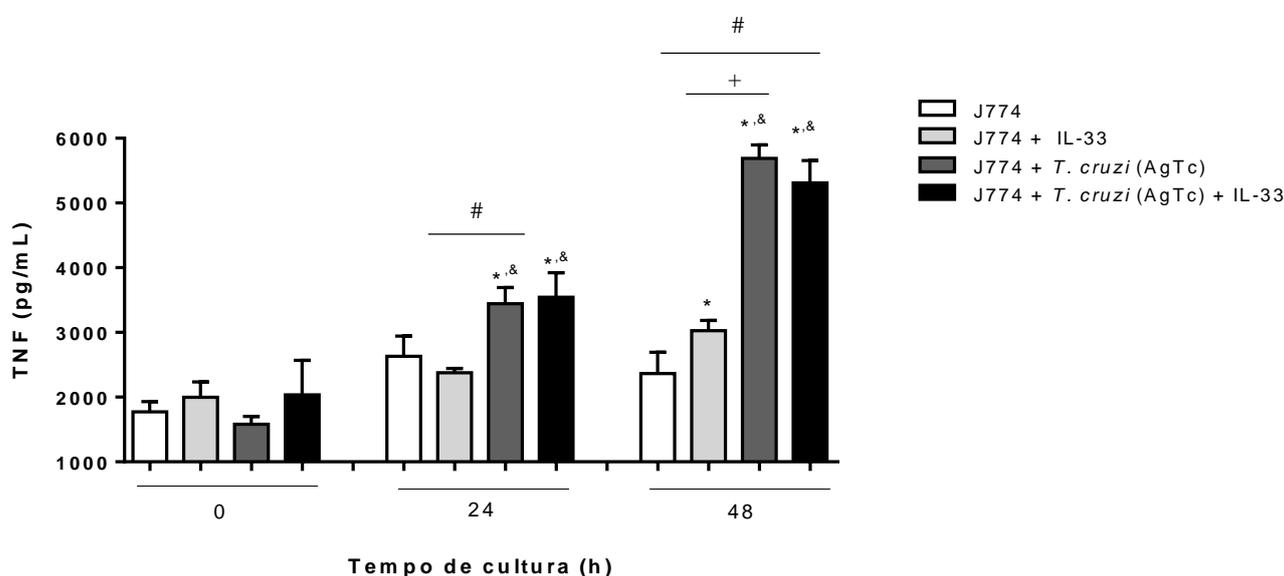


Figura 5-Avaliação do mediador inflamatório TNF em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o *T. cruzi* (AgTc). Dosagem de TNF (pg/mL) em sobrenadante celular, avaliado pelo ELISA, para os grupos: J774; J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi* (AgTc); J774 + *T. cruzi* (AgTc) + IL-33. Nos tempos de 0h, 24h, 48h. * p<0,05 em comparação ao grupo controle. & p<0,05 em comparação ao grupo J774 + IL-33. # p<0,05 em comparação ao grupo J774+*T. cruzi* (AgTc). # p<0,05 para os grupos J774; J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi* (AgTc); J774 + *T. cruzi* (AgTc) + IL-33 em relação aos diferentes tempos (0h,24h e 48h) e para o tempo 48h em relação ao 24h (+).

Para a citocina pró-inflamatória IL-17 é observado uma redução na sua produção no grupo J774+ *T. cruzi* (AgTc) em relação ao grupo J774+IL-33 (&) em um tempo de 0h (Figura 6). No tempo de 24h não existe diferença estatística entre os grupos. No tempo de 48h houve um aumento da citocina nos grupos J774+IL-33 e J774+ *T. cruzi*(AgTc) em relação ao grupo controle (J774) (*). As diferenças entre os tempos são observadas no

grupos: J774+*T. cruzi* (AgTc) e J774+*T. cruzi* (AgTc)+IL-33 no tempo de 24h e de 48h em relação ao tempo 0h (#).

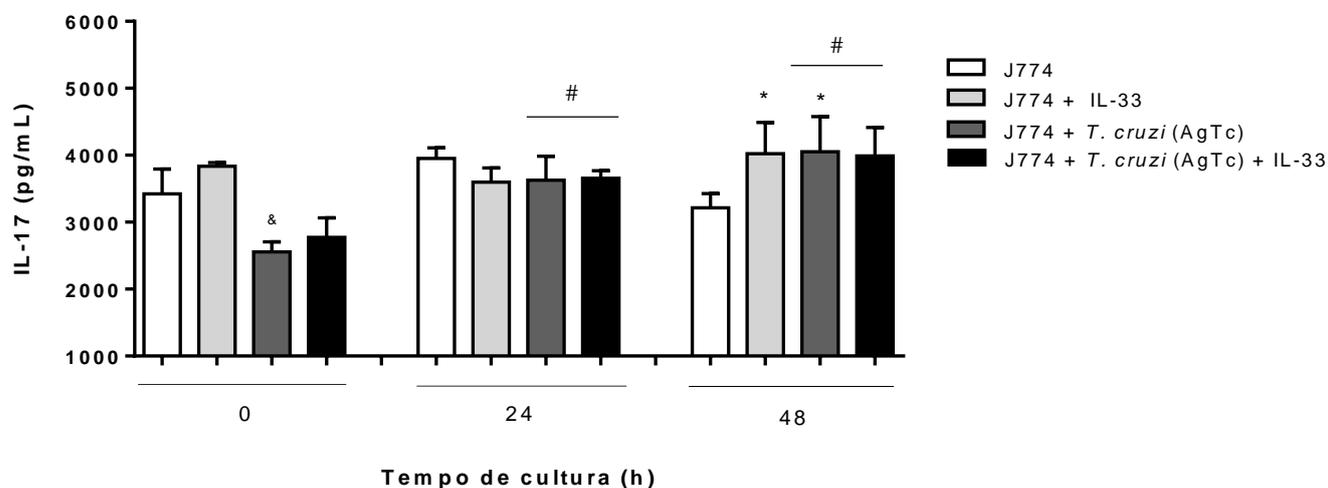


Figura 6-Avaliação do mediador inflamatório IL-17 em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o *T. cruzi* (AgTc). Dosagem de IL-17 (pg/mL) em sobrenadante celular, avaliado pelo ELISA, para os grupos: J774; J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi* (AgTc); J774 + *T. cruzi* (AgTc) + IL-33. Nos tempos de 0h, 24h, 48h. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle. & $p < 0,05$ em comparação ao grupo J774 + IL-33. α $p < 0,05$ em comparação ao grupo J774+*T. cruzi* (AgTc). # $p < 0,05$ para os grupos J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi* (AgTc); J774 + *T. cruzi* (AgTc) + IL-33 em relação aos diferentes tempos (0h,24h e 48h) e para o tempo 48h em relação ao 24h (+).

As análises da quimiocina de atração CCL2 indicam diferenças estatísticas para o grupo J774+IL-33 em relação ao grupo controle (J774) (*) no tempo de 24h (Figura 7). Entre os mesmos grupos as diferenças estatísticas em relação ao tempo, estão presentes nos grupos J774+IL33, J774+*T. cruzi*(AgTc)+IL-33 no tempo de 24h, em relação ao tempo 0h (#) e nos grupos J774+IL33, J774+*T. cruzi*(AgTc), J774+*T. cruzi*(AgTc)+IL-33 em relação ao tempo 0 (#). Ainda observou-se diferenças no grupo J774+*T. cruzi*(AgTc) de 48h em relação ao mesmo grupo no tempo de 24h (+).

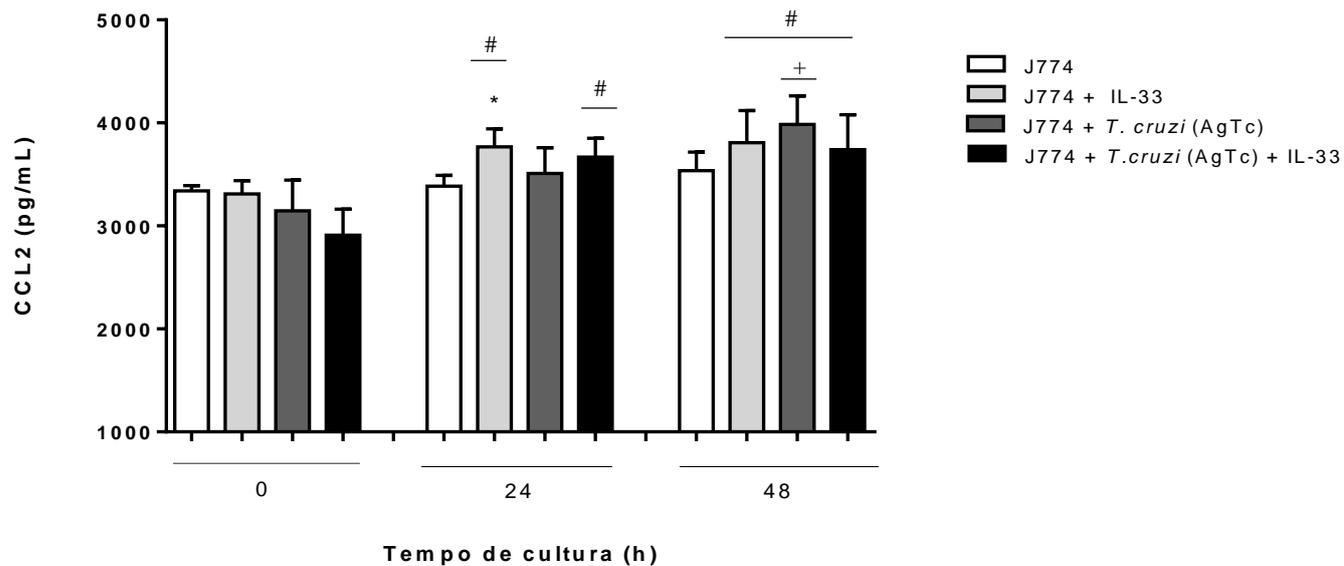


Figura 7-Avaliação do mediador inflamatório CCL2 em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o *T. cruzi* (AgTc). Dosagem de CCL2 (pg/mL) em sobrenadante celular, avaliado pelo ELISA, para os grupos: J774; J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi* (AgTc); J774 + *T. cruzi* (AgTc) + IL-33. Nos tempos de 0h, 24h, 48h. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle. & $p < 0,05$ em comparação ao grupo J774 + IL-33. α $p < 0,05$ em comparação ao grupo J774 + *T. cruzi* (AgTc). # $p < 0,05$ para os grupos J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi* (AgTc); J774 + *T. cruzi* (AgTc) + IL-33 em relação aos diferentes tempos (0h, 24h e 48h) e para o tempo 48h em relação ao 24h (+).

Para a citocina IL-10 (regulatória) não foi observada diferença entre os grupos e entre os tempos (Figura 8).

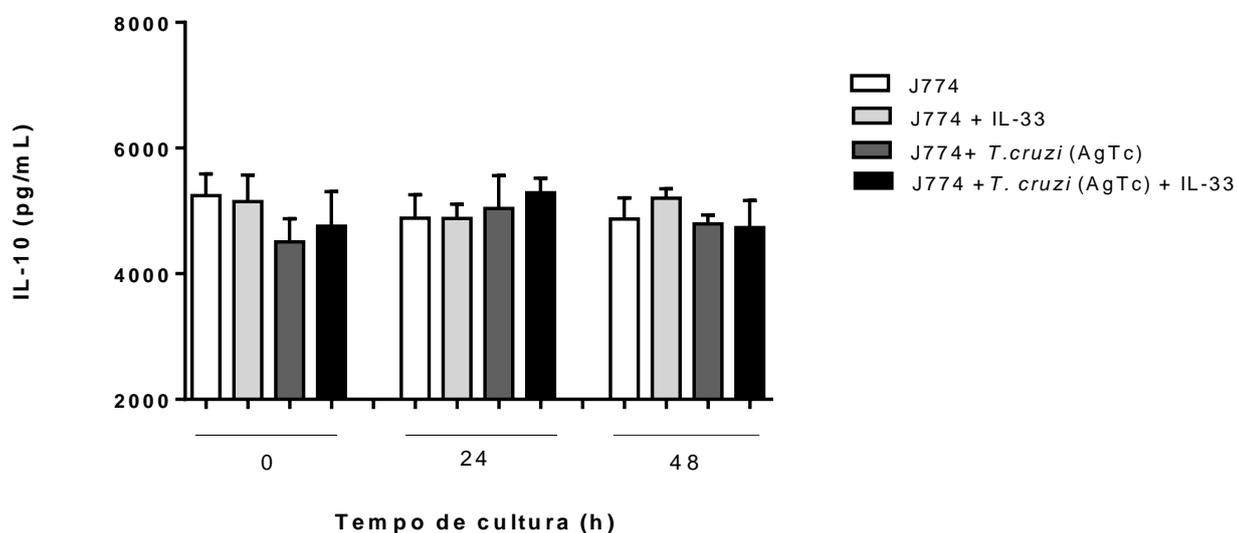


Figura 8-Avaliação do mediador inflamatório IL-10 em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o *T. cruzi* (AgTc). Dosagem de IL-10 (pg/mL) em sobrenadante celular, avaliado pelo ELISA, para os grupos: J774; J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi* (AgTc); J774 + *T. cruzi* (AgTc) + IL-33. Nos tempos de 0h, 24h, 48h. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle. & $p < 0,05$ em comparação ao grupo J774 + IL-33. α $p < 0,05$ em comparação ao grupo J774 + *T. cruzi* (AgTc). # $p < 0,05$ para os grupos (J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi* (AgTc); J774 + *T. cruzi* (AgTc) + IL-33 em relação aos diferentes tempos (0h, 24h e 48h) e para o tempo 48h em relação ao 24h (+).

5.3 Avaliação da produção de nitrito com estimulação antigênica

Para a dosagem de nitrito pelo método de Griess, foi observado diferença para o grupo J774 + *T. cruzi* (AgTc) + IL-33 em relação ao grupo controle (*) e em relação ao grupo J774 + IL-33 (&) (Figura 9). Da mesma forma houve diferença para o grupo: J774 + *T. cruzi* (AgTc) + IL-33 no tempo de 24h e para os grupos: J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi* (AgTc); J774 + *T. cruzi* (AgTc) + IL-33, em 48h, em relação ao tempo de 0h (#) e para os dois últimos grupos no tempo de 48h em relação ao de 24h (+).

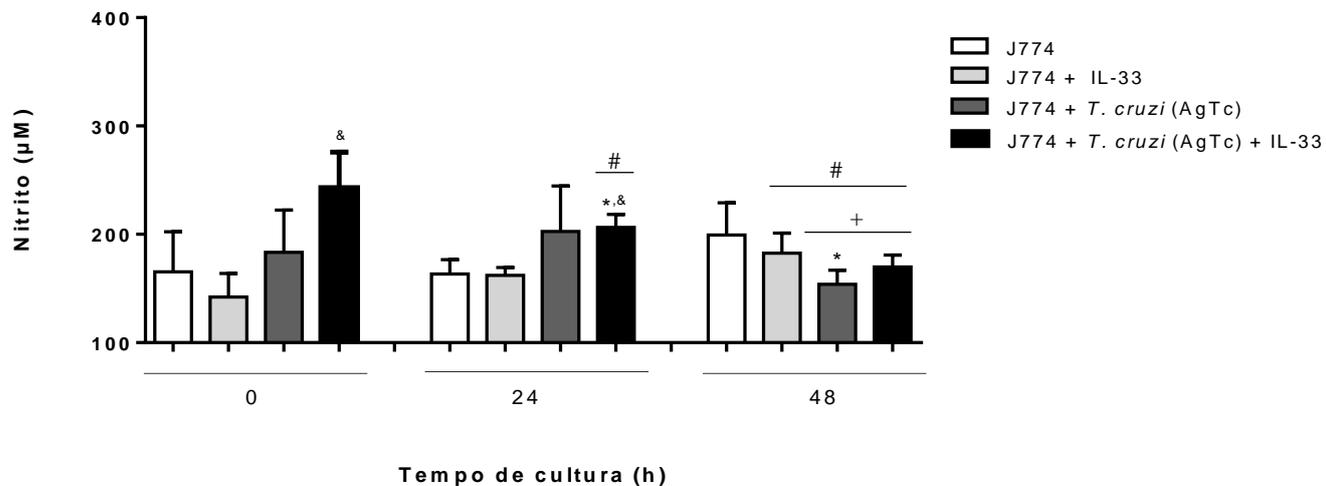


Figura 9-Avaliação das concentrações de nitrito em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o *T. cruzi* (AgTc). Dosagem de nitrito em sobrenadante celular, avaliado pelo método de Griess, para os grupos: J774; J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi* (AgTc); J774 + *T. cruzi* (AgTc) + IL-33. Nos tempos de 0h, 24h, 48h. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle. & $p < 0,05$ em comparação ao grupo J774 + IL-33. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo J774+*T. cruzi* (AgTc). # $p < 0,05$ para os grupos J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi* (AgTc); J774 + *T. cruzi* (AgTc) + IL-33 em relação aos diferentes tempos (0h,24h e 48h) e para o tempo 48h em relação ao 24h (+).

5.4 Produção de mediadores inflamatórios com estimulação pelo *T. cruzi*

Avaliamos a produção de mediadores inflamatórios após estímulo com a forma tripomastigota metacíclica do *T. cruzi*. Para as citocinas TNF (Figura 10), IL-17 (Figura 11) e IL-10 (Figura 13) são observadas diferenças, assim como para a quimiocina CCL2 (Figura 12).

A produção do TNF é elevada nos grupos J774+*T. cruzi* em relação ao grupo J774+IL-33 (&) e elevada em J774+*T. cruzi*, J774+*T. cruzi*+IL-33 em relação ao controle (J774) (*) e em relação ao grupo J774+IL-33 (&), em um tempo de 24h e de 48h (Figura 10). Já em relação aos diferentes tempos, é observado o aumento desta citocina no grupos J774+IL-33, J774+*T. cruzi*, J774+*T. cruzi*+IL-33 no tempo de 24h e 48h em relação ao tempo 0h (#), de modo que este aumento é mais expressivo nos grupos J774+*T. cruzi*, J774+*T. cruzi*+IL-33 no tempo de 48h em relação ao de 24h (+).

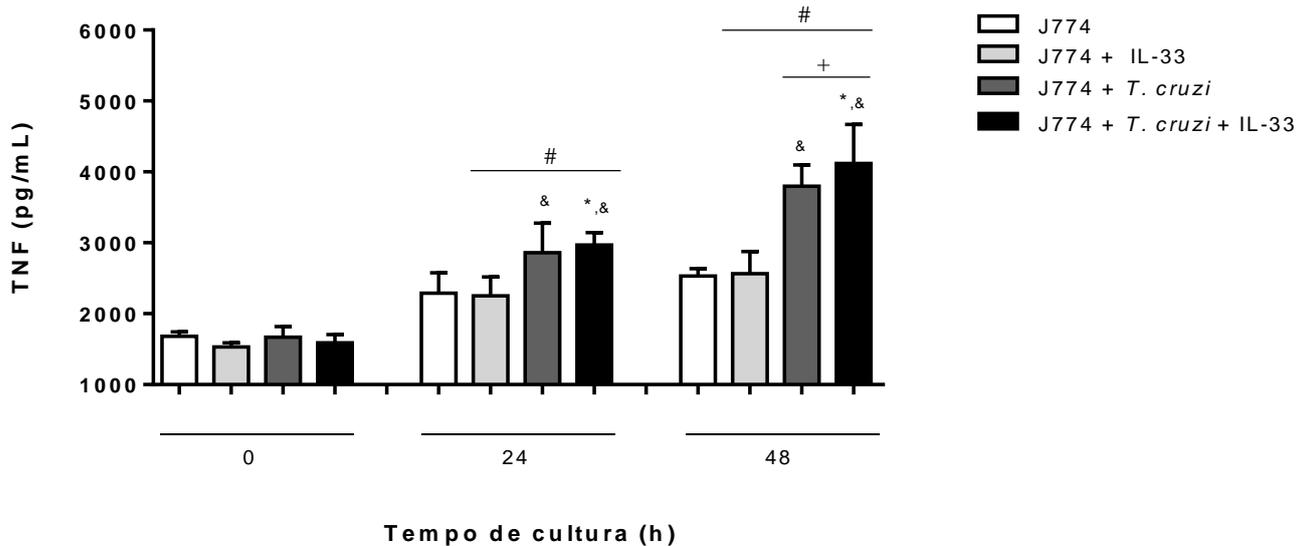


Figura 10-Avaliação do mediador inflamatório TNF em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o *T. cruzi* (parasito vivo). Dosagem de TNF (pg/mL) em sobrenadante celular, avaliado pelo ELISA, para os grupos: J774; J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi*; J774 + *T. cruzi* + IL-33. Nos tempos de 0h, 24h, 48h. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle. & $p < 0,05$ em comparação ao grupo J774 + IL-33. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo J774+*T. cruzi*. # $p < 0,05$ para os grupos (J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi*; J774 + *T. cruzi*+ IL-33) em relação aos diferentes tempos (0h,24h e 48h) e para o tempo 48h em relação ao 24h (+).

As diferenças estatísticas da citocina inflamatória IL-17 são observadas nos grupos: J774+*T. cruzi*+IL-33 em relação ao grupo controle (J774) (*) e em relação ao grupo J774+IL-33 (&) no tempo de 0h (Figura 11). No tempo de 24h as diferenças estão presentes nos grupos: J774+*T. cruzi* e no J774+*T. cruzi*+IL-33 em relação ao grupo controle (J774) (*). E para o tempo de 48h a diferença está presente no grupo J774+*T. cruzi*+IL-33 em relação ao grupo J774+IL-33 e em relação ao grupo J774+*T. cruzi*. Já as diferenças entre os tempos são observadas nos grupos: J774+*T. cruzi*+IL-33 no tempo de 24h em relação ao tempo 0h (#), J774+*T. cruzi* e J774+*T. cruzi*+IL-33 no tempo de 48h em relação ao tempo 0h (#).

E diferenças no tempo de 48h em relação ao tempo de 24h (+) são apontadas para os grupos J774+IL-33 e J774+*T. cruzi*.

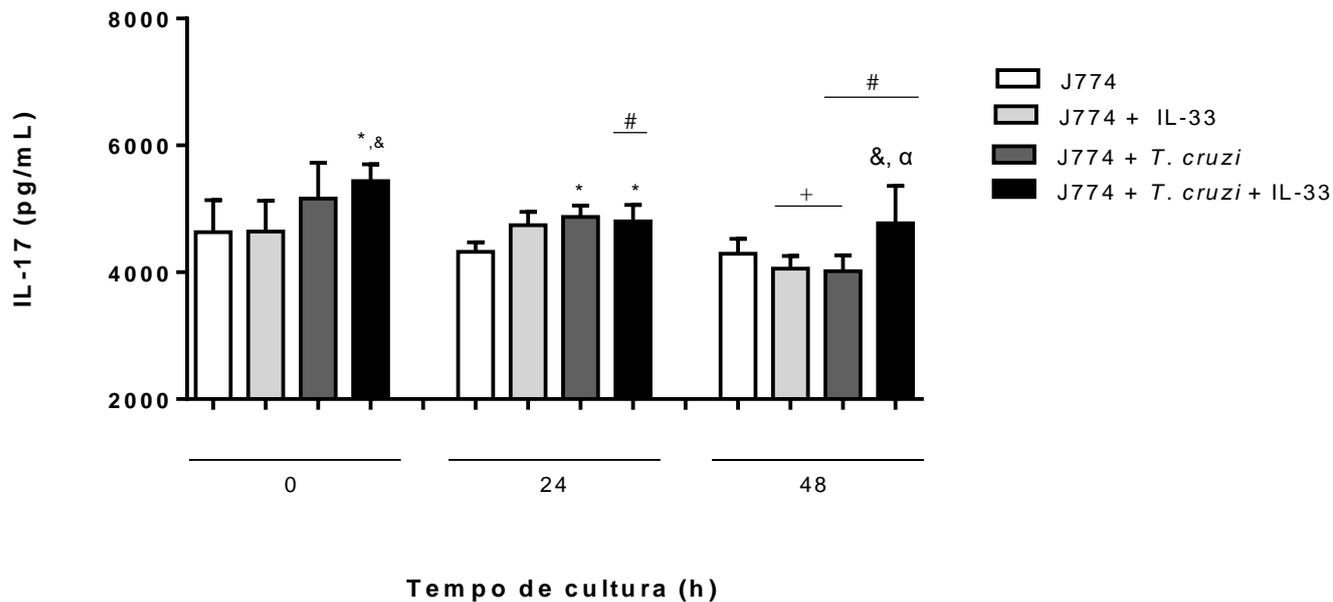


Figura 11-Avaliação do mediador inflamatório IL-17 em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o *T. cruzi* (parasito vivo). Dosagem de IL-17 (pg/mL) em sobrenadante celular, avaliado pelo ELISA, para os grupos: J774; J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi*; J774 + *T. cruzi* + IL-33. Nos tempos de 0h, 24h, 48h. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle. & $p < 0,05$ em comparação ao grupo J774 + IL-33. α $p < 0,05$ em comparação ao grupo J774+*T. cruzi*. # $p < 0,05$ para os grupos (J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi*; J774 + *T. cruzi* + IL-33) em relação aos diferentes tempos (0h,24h e 48h) e para o tempo 48h em relação ao 24h (+).

As diferenças estatísticas encontrada para a quimiocina CCL2 são apontadas nos grupo J774+*T. cruzi*+IL-33 em relação ao grupo controle (J774) (*) no tempo de 24h, e para os grupos no tempo de 48h: J774+*T. cruzi*, J774+*T. cruzi*+IL-33 em relação ao grupo J774+IL-33 (&) e para o grupo J774+*T. cruzi*+IL-33 em relação ao controle (J774) (*) (Figura 12).

Em relação aos mesmos grupos nos diferentes tempos, observa-se diferença estatística para os grupos: J774+IL-33 e J774+*T. cruzi*+IL-33 no tempo de 24h em relação aos mesmos grupos no tempo de 0h (#). E para os grupos J774+IL-33, J774+*T. cruzi*, J774+*T. cruzi*+IL-33 no tempo de 48h em relação aos mesmos grupos no tempo de 0h (#).

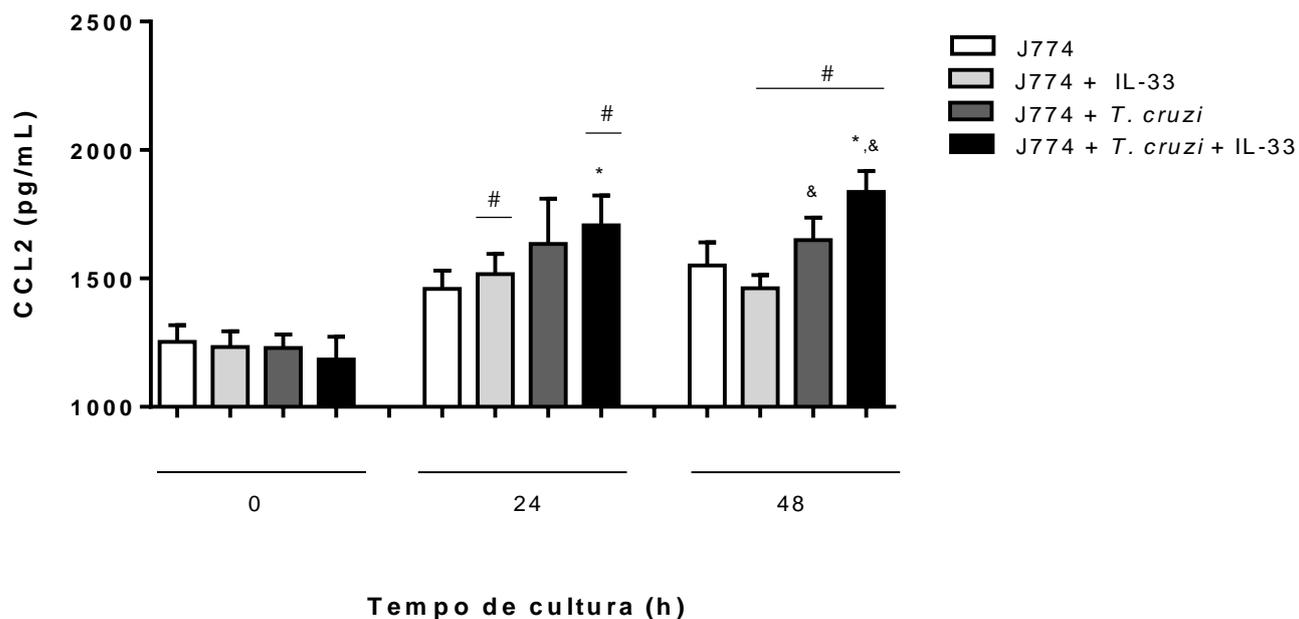


Figura 12-Avaliação do mediador inflamatório CCL2 em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o *T. cruzi* (parasito vivo). Dosagem de IL-17 (pg/mL) em sobrenadante celular, avaliado pelo ELISA, para os grupos: J774; J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi*; J774 + *T. cruzi* + IL-33. Nos tempos de 0h, 24h, 48h. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle. & $p < 0,05$ em comparação ao grupo J774 + IL-33. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo J774+*T. cruzi*. # $p < 0,05$ para os grupos (J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi*; J774 + *T. cruzi* + IL-33) em relação aos diferentes tempos (0h,24h e 48h) e para o tempo 48h em relação ao 24h (+).

Na avaliação da citocina IL-10 foi observada diferença em relação aos grupos apenas no tempo de 24 horas para os grupos: J774+*T. cruzi*, J774+*T. cruzi*+IL-33 em relação ao grupo controle (J774) (*) e em relação ao grupo J774+IL-33 (&) (Figura 13). Em relação aos diferentes tempos observou-se estas diferenças nos grupos J774+*T. cruzi*, J774+*T. cruzi*+IL-33 no tempo de 48h, em relação aos mesmos grupos no tempo de 0h (#). Além disso, houve diferença também nos grupos J774+ IL-33, J774+*T. cruzi*+IL-33, em relação ao seus respectivos grupos no tempo de 24h(+).

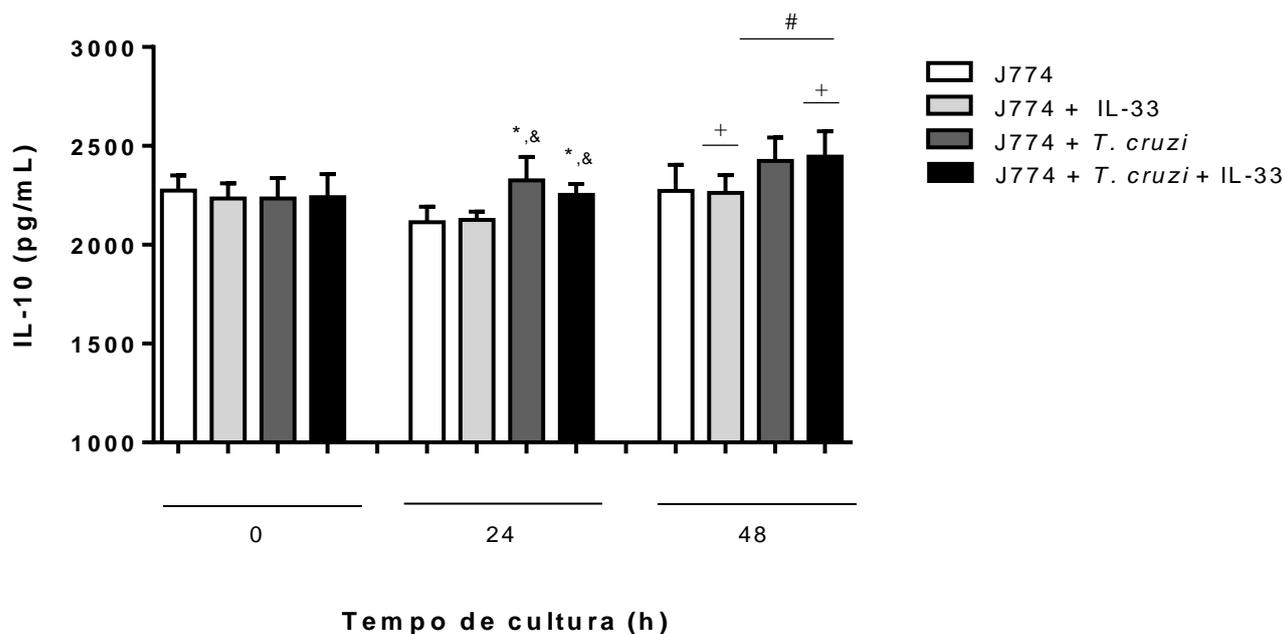


Figura 13-Avaliação do mediador inflamatório IL-10 em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o *T. cruzi* (parasito vivo). Dosagem de IL-10 (pg/mL) em sobrenadante celular, avaliado pelo ELISA, para os grupos: J774; J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi*; J774 + *T. cruzi* + IL-33. Nos tempos de 0h, 24h, 48h. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle. & $p < 0,05$ em comparação ao grupo J774 + IL-33. α $p < 0,05$ em comparação ao grupo J774+*T. cruzi*. # $p < 0,05$ para os grupos (J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi*; J774 + *T. cruzi* + IL-33) em relação aos diferentes tempos (0h,24h e 48h) e para o tempo 48h em relação ao 24h (+).

5.5 Avaliação da produção de nitrito com estimulação pelo *T. cruzi*

Realizou-se a dosagem de nitrito pelo método de Griess onde as diferenças estatísticas entre os grupos em um determinado tempo, são apontadas ao tempo de 0h nos grupos J774+IL-33 e J774+*T. cruzi* em relação ao controle (J774) (*) e ao tempo de 24h para o grupo J774+*T. cruzi*+IL-33 em relação ao grupo J774+IL-33 (&) (Figura 14).

Comparado os tempos observou-se diferenças para os grupos J774+*T. cruzi*+IL-33 no tempo de 24h em relação ao seu respectivo no tempo de 0h e para os grupos J774+IL-33, J774+*T. cruzi*+IL-33 no tempo de 48h em relação ao seu respectivo no tempo de 0h.

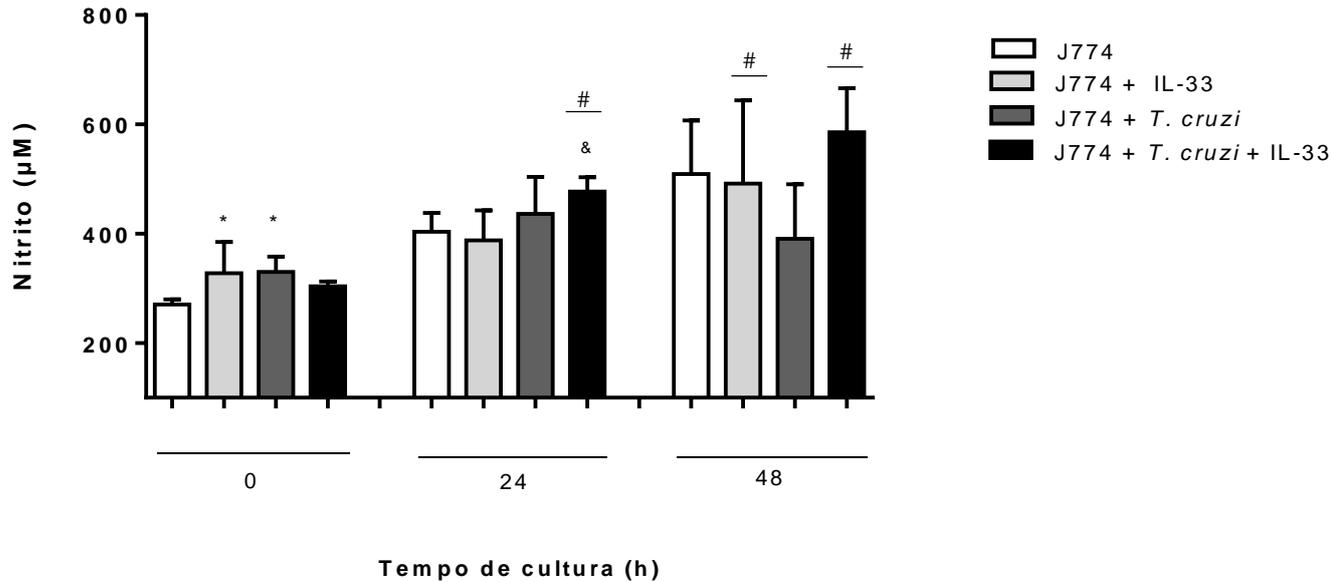


Figura 14-Avaliação das concentrações de nitrito em cultura de células da linhagem J774 estimuladas com o *T. cruzi* (parasito vivo). Dosagem de nitrito em sobrenadante celular, avaliado pelo método de Griess, para os grupos: J774; J774 + IL-33; J774 + *T. cruzi*; J774 + *T. cruzi*+ IL-33. Nos tempos de 0h, 24h, 48h. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle. & $p < 0,05$ em comparação ao grupo J774 + IL-33. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo J774+*T. cruzi*. # $p < 0,05$ para os grupos (J774 + IL-33; J774 +*T. cruzi*; J774 + *T. cruzi*+ IL-33) em relação aos diferentes tempos (0h,24h e 48h) e para o tempo 48h em relação ao 24h (+).

5.6 Avaliação da porcentagem de células infectadas pelo *T. cruzi*

Avaliou-se a quantidade de células infectadas entre os grupos J774+*T. cruzi*, J774+*T. cruzi*+IL-33 (Figura 15). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos em um mesmo tempo (24 ou 48h) e nem entre os mesmos grupos em diferentes tempos.

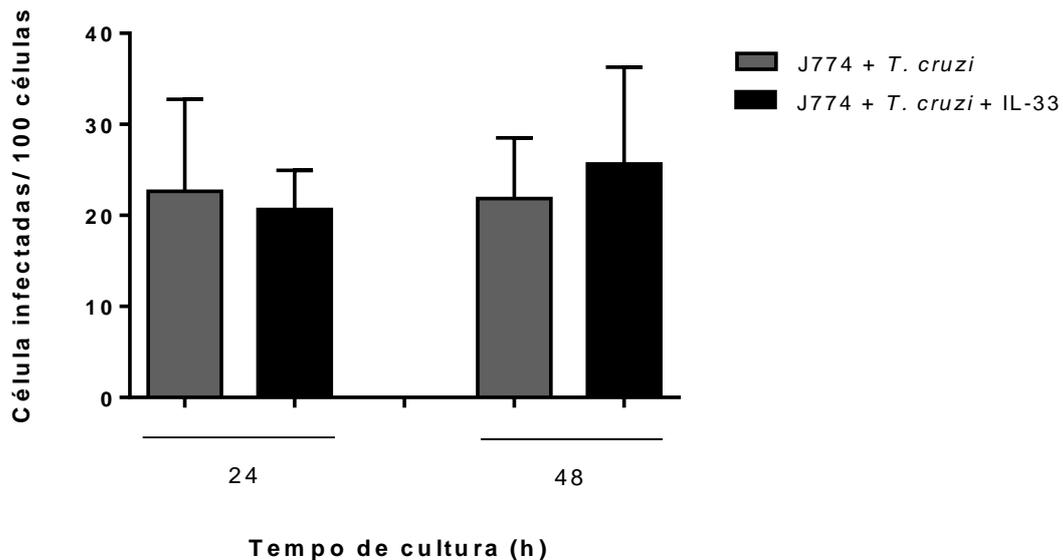


Figura 15- Quantidade de células infectadas nos grupos *J774+T. cruzi* e *J774+T. cruzi+IL-33* nos tempos de 24h e de 48h. α $p < 0,05$ em comparação ao grupo *J774+T. cruzi*. + $p < 0,05$ em relação ao tempo de 24h.

Para a contagem de amastigota realizada, foi observada diferenças estatísticas entre os grupos no mesmo tempo para o grupo *J774+T. cruzi+IL-33* em relação ao grupo *J774+T. cruzi* (α) no tempo de 24h, porém isso não é observado no tempo de 48h (Figura 16). Entretanto observa-se diferenças entre os diferentes tempos apenas para o grupo *J774+T. cruzi+IL-33* no tempo de 48h em relação ao seu respectivo no tempo de 24h (+).

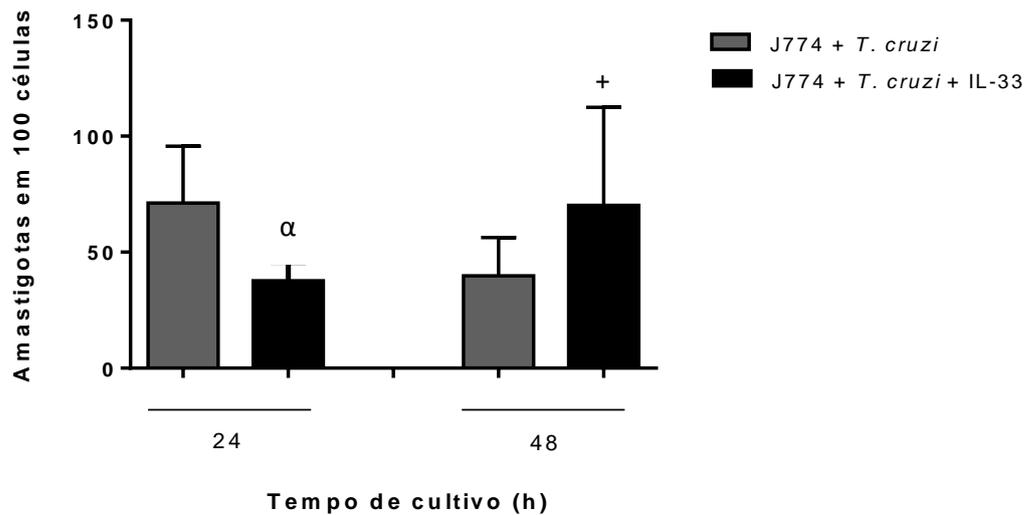


Figura 16- Quantidade de amastigotas em células infectadas nos grupos J774+*T. cruzi* e J774+*T. cruzi*+IL-33 nos tempos de 24h e de 48h. α p<0,05 em comparação ao grupo J774+*T. cruzi*. + p<0,05 em relação ao tempo de 24h.

5.7 Dados de correlação

No quadro 3, é apresentado os dados de correlação (R^2 e P valor) das citocinas TNF e IL-10 em relação ao número de células infectadas e de amastigotas. Os dados de P valor não foram significativos para os grupos analisados em nenhuma das correlações.

Quadro 3- Dados de correlação de células infectadas e amastigotas com as citocinas TNF e IL-10.

NÚMERO DE CÉLULAS INFECTADAS (TEMPO 24H)			NÚMERO DE AMASTIGOTA EM CÉLULAS INFECTADAS (TEMPO 24H)		
TNF	<i>J774+T. cruzi</i>	R= 0.5872	<i>J774+T. cruzi</i>	R= -0.04580	
		P= 0.2979		P= 0.9417	
	<i>J774+T. cruzi+IL-33</i>	R= -0.8229	<i>J774+T. cruzi+IL-33</i>	R= -0.7611	
		P= 0.0870		P= 0.1351	
IL-10	<i>J774+T. cruzi</i>	R= -0.2353	<i>J774+T. cruzi</i>	R= 0.02899	
		P= 0.5944		P= 0.9944	
	<i>J774+T. cruzi+IL-33</i>	R= -0.02132	<i>J774+T. cruzi+IL-33</i>	R= 0.03145	
		P= 0.9680		P= 0.9528	
NÚMERO DE CÉLULAS INFECTADAS (TEMPO 48H)			NÚMERO DE AMASTIGOTA EM CÉLULAS INFECTADAS (TEMPO 48H)		
TNF	<i>J774+T. cruzi</i>	R= 0.2731	<i>J774+T. cruzi</i>	R= 0.3298	
		P= 0.6566		P= 0.5878	
	<i>J774+T. cruzi+IL-33</i>	R= -0.4244	<i>J774+T. cruzi+IL-33</i>	R= -0.3550	
		P= 0.4763		P= 0.5576	
IL-10	<i>J774+T. cruzi</i>	R= 0.7584	<i>J774+T. cruzi</i>	R= 0.7781	
		P= 0.0805		P= 0.0684	
	<i>J774+T. cruzi+IL-33</i>	R= -0.07223	<i>J774+T. cruzi+IL-33</i>	R= -0.2898	
		P= 0.8918		P= 0.5774	

6. DISCUSSÃO

Estudos desenvolvidos por Kim *et al.*, 2012 utilizando camundongos BALB/c com rinite alérgica, demonstram que o tratamento destes animais com o anticorpo anti-IL-33 reduziu o processo alérgico. Também houve redução do infiltrado, redução das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, assim como redução de anticorpos do tipo IgE e o IgE específico para a ovoalbumina.

Em infecções helmínticas, como por exemplo, pelo *Trichuris muris* (Humphreys *et al.*, 2008) a citocina apresenta o papel de eliminação do nematódeo. Ela direciona para uma resposta do tipo Th2 no início da infecção, além de estimular a síntese de IL-4, IL-13 e IL-9 quando uma resposta Th1 já foi estabelecida. Já nas infecções causadas por *Strongyloides venezuelensis* e *Nippostrongylus brasiliensis*, é possível observar que não há eficiência na eliminação desses parasitas na ausência da IL-33 (Hung *et al.*, 2012; Yasuda *et al.*, 2012) ou do seu receptor ST2 (Scalfone *et al.*, 2013).

Apesar de se saber que a IL-33 é uma citocina que pertence à família da citocina IL-1 e que desempenha funções importantes em processos alérgicos e em infecções por helmintos, o conhecimento acerca do seu papel na infecção por protozoários como o *Trypanosoma cruzi* é relativamente novo. No trabalho desenvolvido por Medeiros *et al.*, 2019, os indivíduos que apresentaram a forma indeterminada e cardíaca crônica da doença de Chagas não diferiram em relação à expressão desta citocina em diferentes tipos celulares (neutrófilos, monócitos clássicos, monócitos inflamatórios e monócitos de patrulha). Isto indica que a IL-33 não participa da progressão da forma indeterminada para a forma cardíaca crônica da doença e que a sua participação provavelmente estaria presente nas etapas iniciais da infecção pelo *T. cruzi*.

Entretanto, no modelo de doenças cardiovasculares a resposta desta citocina se difere da mencionada anteriormente. No trabalho de Seki *et al.*, 2009, observou-se que o tratamento com a IL-33 inibiu a apoptose de cardiomiócitos em ratos e melhorou a função cardíaca em camundongos após o infarto do miocárdio, além de aumentar a sua sobrevivência.

Estudos envolvendo a infecção por outros protozoários demonstraram que a IL-33 parece ser importante nas primeiras etapas do processo de eliminação do agente parasitário. Na infecção pelo *Toxoplasma gondii*, quando há ausência do ST2 (receptor da IL-33), a resposta Th1 encontra-se exacerbada devido à elevação do NO, TNF e IFN, desencadeando um quadro de encefalite (Jones *et al.*, 2010). Assim, a IL-33 atuaria como

citocina regulatória mantendo o equilíbrio entre a resposta Th1 e Th2. Na infecção pelo *Plasmodium berghei*, agente causador da malária cerebral, foi demonstrado que o tratamento de camundongos C57BL/6 infectados com a IL-33 é capaz de inibir o desenvolvimento da doença, além de reduzir os níveis de mediadores inflamatórios na circulação (Besnard *et al.*, 2015). Dessa forma a IL-33 também atuaria como uma citocina protetora.

Ao avaliarmos a ação desta citocina na infecção ou estimulação de células J774 pelo *T. cruzi*, observamos um aumento da produção da citocina TNF. O TNF é de suma importância em infecções, participando da ativação de células, estimulando produção de outras citocinas, além de desencadear respostas de morte celular (Quadro 1). As diferenças do TNF em nosso experimento, nos grupos estimulados apenas com o antígeno em ambos os tempos, corroboram com o trabalho desenvolvido por Gomes *et al.*, 2014. No mesmo observou-se um aumento na produção do TNF 18h após o estímulo utilizando o antígeno (25µg/mL) da cepa CL do *T. cruzi*, nos grupos de células Mononucleares do sangue periférico (PBMC) e no grupo não aderente, nos indivíduos não infectados, em comparação ao controle (não estimulados com o antígeno).

A produção do TNF em nossos dados foi superior, o que provavelmente se deve ao tempo de estímulo e à concentração de antígeno utilizado como estímulo (100µg/mL). Este perfil é também observado nos resultados utilizando a forma tripomastigota como estímulo, o que corrobora com os dados de Rezende-Oliveira e colaboradores (2012) onde as células PBMC's e as células do sangue total, estimuladas com a forma tripomastigota da cepa Y, mostraram o aumento da produção do TNF no grupo estimulado em relação ao controle (não estimulados).

Nossos dados ainda mostram a liberação do TNF no tempo de 24h e no tempo de 48h no grupo de células estimuladas apenas com a IL-33. Este dado corrobora com os experimentos desenvolvidos por Moulin e colaboradores (2007), onde mastócitos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6, foram estimulados com a IL-33 (10ng/ml), proporcionaram a liberação do TNF em um tempo de 24h.

Nossos dados ainda enfatizam que a IL-33 induz a produção de TNF independente da utilização do antígeno ou do *T. cruzi* vivo, no tempo de 24h e 48h em relação ao tempo 0 e demonstram o aumento do TNF no tempo de 48h em relação ao de 24h. Entretanto na presença de ambos os estímulos (*T. cruzi* e IL-33), mesmo sem a confirmação estatística, observou-se diferença na produção do TNF, entre os valores dos grupos analisados, mostrando-se maior no tempo de 48h em relação ao grupo que só foi

estimulado pelo *T. cruzi*. Em contraste, o grupo estimulado pela citocina e pelo Ag apresentou uma menor produção de TNF quando comparado ao grupo estimulado apenas pelo Ag. O efeito da IL-33 em estimular a produção de TNF em um contexto inflamatório foi confirmado pelo trabalho de Aoki e colaboradores (2013), utilizando o vírus da herpes simplex. Observou-se que o tratamento de mastócitos derivados da medula óssea com a IL-33 induziu a liberação de TNF e de IL-6. A IL-33 liberada se liga em seu receptor e ativa a via do NFκB, que culmina na produção de citocinas, como o TNF em resposta ao dano celular. De fato, em ambas infecções ocorreu dano celular que culminou na produção de TNF. Assim, acredita-se que a IL-33 tenha uma participação importante na uma resposta inflamatória contra o *T. cruzi*.

Em relação a citocina IL-17, foi observada em nosso resultado a sua produção nos tempos de 24h e 48h para todos os grupos estimulados com o antígeno. Esse padrão é diferente no trabalho de Da Matta Guedes e colaboradores (2010) que, utilizando antígenos da forma tripomastigota da cepa Y (10ng/poço), observou em cultura de esplenócitos durante 72h, que não houve a produção da citocina IL-17. Provavelmente esta diferença de produção da citocina entre os trabalhos se deve a quantidade de antígeno utilizada como estímulo, sendo que em nosso estudo foram utilizados 100µg/mL. Nos dados deste autor, é observado a produção da IL-17 no tempo de 48h em cultura de esplenócitos utilizando o parasito vivo. Este dado se difere do nosso trabalho, já que a produção da IL-17 se inicia 24h após o estímulo com o parasito vivo.

Pouco se sabe sobre a interação entre a IL-33 e a citocina IL-17. A literatura demonstra que a relação entre as duas citocinas citadas varia na dependência do modelo aplicado e que a IL-33 interfere na resposta da IL-17. Exemplo disso é apontado com a administração da IL-33 elevando produção da citocina IL-17 no modelo sepse induzida *in vivo* (Li *et al.*,2016). E mesmo que este modelo seja distinto ao proposto com o *T. cruzi*, mostramos que houve a produção da IL-17 em resposta ao estímulo com o *T. cruzi* e com a IL-33 nos tempos de 24h e 48h.

Ainda cabe ressaltar que a produção da IL-17 no grupo combinado (*T. cruzi* + IL-33) foi maior do que no grupo estimulado apenas com o *T. cruzi*, o que indica a participação da IL-33 na produção de IL-17 durante a infecção por *T. cruzi*. Isto se difere do observado por Lv e colaboradores (2017), onde o tratamento com a IL-33 aumentou a sobrevivência dos animais com sepse e inibiu a produção de citocinas inflamatórias a partir da inibição da via da IL-17. Entretanto, as respostas da IL-33 variaram neste mesmo modelo, pois a administração da IL-33 induziu ao aumento de neutrófilos para combater

a infecção, caracterizando um efeito protetor (Alves-Filho *et al.*,2010). Em outro estudo, a ausência do receptor da IL-33 (ST2) resultou no aumento da susceptibilidade à infecção pela sepse e redução da população de células inflamatórias (neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e células dendríticas), além de redução na população de células NK produtoras de IFN e de células IL-17 (Babic *et al.*, 2018).

A CCL2 é uma quimiocina que promove o recrutamento de leucócitos ao local inflamado, desta forma a sua ação é essencial durante infecções. Já foi demonstrado o papel da CCL2 na infecção humana e experimental pelo *T. cruzi* (Talvani *et al.*,2004; Ramasawmy *et al.*, 2006; Yamauchi *et al.*, 2007; Paiva *et al.*,2009). Sendo assim considerada uma quimiocina padrão para avaliação na resposta inflamatória contra o *T. cruzi*. Em nossos resultados, observou-se a produção de CCL2 nos grupos estimulados com o antígeno em 24h e 48h. Nos experimentos desenvolvidos por Talvani *et al.*,2004 utilizando cultura de PBMC's de indivíduos portadores da doença de Chagas, foi realizado o estímulo durante 24h com antígenos do *T. cruzi* obtidos da forma tripomastigota (sem especificação da cepa) (25µg/mL). Foi observado o aumento da produção da quimiocina nos grupos que apresentaram a cardiomiopatia chagásica crônica em relação ao grupo controle (não apresentou a doença). A produção da CCL2 nos cardiopatas com a forma grave, em detrimento da forma mais branda, foi mais elevada. Entretanto alguns indivíduos não infectados produziram a quimiocina, porém em concentrações menores comparando-se aos outros grupos. Este padrão foi observado em nossos dados, uma vez que observamos que a produção de CCL2 foi maior em pequenas concentrações, nos grupos estimulados com antígeno. Isto provavelmente ocorre durante o processo de reconhecimento do antígeno pela célula. Por este ser o único estímulo, aplicado apenas uma vez, a célula irá reconhecer o corpo estranho do ambiente e produzir mediadores inflamatórios, uma vez que neste contexto, a célula estaria lidando com uma possível infecção e o que ela estaria reconhecendo seria uma pequena fração de um patógeno.

A produção da CCL2 em nosso estudo foi semelhante nos grupos estimulados com *T. cruzi*. No trabalho de Nascimento,2015 utilizando formas tripomastigotas da cepa Y em co-cultivo de PBMC's de portadores da fase crônica da doença de Chagas, em 24h, observou-se o aumento da produção de CCL2 em comparação ao grupo controle e ao infectado tratado com benznidazol, onde a produção da citocina aumentou no 5º dia de infecção. Isto já bem estabelecido pela literatura na infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que a

produção desta quimiocina é necessária para o recrutamento de novas células ao local da infecção.

No presente estudo, em ambos as estratégias experimentais (utilizando Ag ou *T. cruzi*) foi observado um aumento na produção de CCL2 devido ao estímulo com a IL-33 nos tempos de 24h e 48h em relação ao tempo 0h. Além disso, a IL-33 por si só (sem o estímulo do Ag) foi capaz de estimular a produção de CCL2 no tempo de 24h. Isso corrobora com os dados observados por Mccauro *et al.*, 2012 onde utilizando mastócitos do cordão umbilical humano tratados com IL-33 (50ng/ml), durante 24h de cultivo, houve produção da CCL2. O fato de a CCL2 ser uma quimiocina de recrutamento leucocitário justifica a sua produção nestes grupos durante o cultivo celular. Provavelmente, parte desta produção ocorreu visando recrutar células inflamatórias para fazerem o *clearance* de células velhas, considerando que o plaqueamento foi feito 1 dia antes do estímulo. Esta resposta também foi descrita para a citocina IL-17, nos trabalhos de Silverpil *et al.*, 2010 onde os macrófagos realizam a fagocitose de neutrófilos velhos e partículas de látex.

A IL-10 é uma citocina regulatória responsável por controlar ou inibir a produção de mediadores inflamatórios e assim manter a homeostase tecidual. Relatos na literatura mostram o seu papel de regulação da resposta imune na infecção pelo *T. cruzi* (Silva *et al.*, 1992; Hunter *et al.*, 1997; Abrahamsohn, 1998; Gomes *et al.*, 2003; Roffê *et al.* 2012)

Em nosso trabalho utilizando o antígeno de *T. cruzi*, não foi observada diferença entre os grupos em relação à produção da citocina IL-10. Esse dado se difere com ao apresentado por Gomes e colaboradores (2003) em que PBMC's derivadas de pacientes chagásicos foram estimulados com antígenos da forma epimastigotas ou tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sendo observado um pico de liberação da citocina 24h após o estímulo. Entretanto observamos um aumento da IL-10 nos grupos infectados com o parasito no tempo de 24h, isto corrobora com o trabalho desenvolvido por Poncini *et al.*, 2008, que utilizou cultura de células dendríticas e a infecção foi realizada por formas tripomastigotas da cepa RA do *T. cruzi* durante 24h também observou o aumento da produção de IL-10 no grupo estimulado com LPS+tripo. Outro trabalho mostrou que em cultura de macrófagos derivados de células que contém colesterol, o tratamento com a IL-33 (10ng/mL) elevou a produção de IL-10 (Zhang *et al.*, 2017). Acredita-se que IL-10 seja importante citocina para o processo inflamatório durante a infecção pelo *T. cruzi*, ao regular a resposta inflamatória durante as fases aguda e a crônica da infecção, sendo neste último caso associado a uma melhora clínica ou redução dos dados patológicos (Hunter *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2004; Roffê *et al.*, 2012).

Além da participação das citocinas na resposta inflamatória contra o *T. cruzi*, sabe-se que a produção de óxido nítrico é essencial para o controle parasitário (Vespa *et al.*, 1994; Gutierrez *et al.*, 2009; Cutrullis *et al.*, 2017; Felizardo *et al.*, 2018). Dessa forma, a sua avaliação em estudos *in vivo* e *in vitro* é frequente. Nossos dados mostraram a sua produção nos grupos estimulados com o antígeno, o que se difere em relação ao observado por Guiñazu e colaboradores (2007). Este trabalho utilizou como antígeno a molécula cruzipain (Cz) da forma epimastigota da cepa Talahuen do *T. cruzi*. Esta molécula é um importante alvo imunogênico presente em ambas as formas do *T. cruzi*. As células foram coletadas do baço de animais previamente imunizados com Cz ou não imunizados (controle imunizado com ovoalbumina). Essas células (células do baço aderentes, células do baço total, células B e T) foram novamente estimuladas por Cz em um tempo de 48h, após o tempo esperado a concentração de NO foi dosada, demonstrando que a produção de NO foi baixa nos grupos não imunizados estimulados para o grupo de células do baço aderentes. Entretanto nos grupos imunizados estimulados com o Cz, a produção de nitrito foi alta para todos os grupos avaliados, com exceção da célula T derivada do baço. Provavelmente a baixa produção de óxido nítrico para as células não imunizadas estimuladas se deve a cepa utilizada ou até mesmo a molécula de Cz, uma vez que para a sua obtenção, fez-se necessário processos de purificação. Enquanto em nosso trabalho, utilizamos o antígeno bruto.

Também observamos a produção de NO nos grupos estimulados com o *T. cruzi*. Isto foi observado no trabalho de Tadokoro & Abrahamsohn (2001) utilizando macrófagos derivados da medula óssea. Estas células foram diferenciadas com GM-CSF ou M-CSF e estimuladas com a forma tripomastigota da cepa Y do *T. cruzi*. Como resultado, observou-se que houve produção de NO e que no grupo GM-CSF foi maior do que no grupo M-MO. Ainda em relação ao NO, observamos em nosso trabalho a sua produção no grupo estimulado apenas com a citocina, sendo que este padrão também foi observado nos trabalhos de Choi *et al.*, 2009.

Ainda, é possível observar que em nosso trabalho houve redução do NO nos grupos estimulados com o Ag com o passar do tempo, mas o contrário ocorreu no experimento com *T. cruzi*. Neste momento o parasito interage com o macrófago, onde haverá o processo da fagocitose para a possível eliminação (produção de espécies reativas, nitrogênio, óxido nítrico) e dessa forma o controle do parasitismo, entretanto devido a presença de enzimas no parasito, ele evade desta resposta e migra para o citosol da célula iniciando sua replicação, diferenciação, rompimento celular e, consequente,

infecção em novas células (Rottenberg & Orn, 1998; Teixeira *et al.*, 2002; Brener *et al.*, 2000; Piacenza *et al.*, 2008; Rassi *et al.*, 2010; De Pablos & Osuna, 2012). Dessa forma, devido à persistência do parasito e necessidade de sua eliminação, este estímulo constante provavelmente induz o aumento do NO ao longo do tempo em cultura celular, diferentemente do experimento utilizando apenas o Ag do parasito. Pelo fato deste Ag ser uma proteína, a célula faz a fagocitose deste “corpo estranho” e o processamento.

Nos dois experimentos do presente trabalho, observamos a produção de NO nos grupos no tempo 0 de infecção. Ambas as células foram plaqueadas 1 dia antes de realizar os devidos estímulos para sua adesão na placa e nas lamínulas. Os dados que encontramos foram semelhantes aos reportados por Oliveira e colaboradores 1999, onde houve a produção de NO no segundo dia após o plaqueamento de PBMC's. Em ambos os trabalhos, acredita-se que a produção precoce de NO visa à eliminação de células mortas pelo processo de fagocitose. Em um ambiente favorável, a medida que as células se multiplicam, ocorre uma redução do espaço livre e um aumento da demanda por fatores necessários para a sua sobrevivência. Além disso, o pH se torna mais ácido devido ao metabolismo celular. Todos esses fatores acabam gerando um stress no meio. Dessa forma, as células que não suportariam este stress morrem e os seus restos seriam fagocitados.

Após a dosagem dos mediadores inflamatórios, realizamos a contagem de amastigotas nas células infectadas. Esta forma é derivada da forma tripomastigota sanguínea ou metacíclica (no nosso caso), que realiza o processo de invasão nas células do hospedeiro mamífero. Este é um método para confirmar a eficácia de fármacos ou de citocinas e ainda inferir se houve sucesso na infecção. Neste contexto, realizamos a contagem de amastigota nos grupos infectados com *T. cruzi* e os infectados estimulados com a IL-33. Não houve diferença em número de células infectadas.

Em relação ao tempo de 24h, houve uma redução no número de amastigotas no grupo estimulado com a IL-33. Sugere-se que este efeito seja causado pelo estímulo à produção de outras citocinas inflamatórias como forma de eliminar o parasito. Porém, este controle da infecção deve ter sido parcial. O aumento da produção da citocina regulatória IL-10 no tempo de 24 horas de cultivo provavelmente inibiu a ação de citocinas pró-inflamatórias, fato que explicaria o aumento posterior do parasitismo evidenciado pelo aumento do número de amastigotas no tempo de 48h. Este dado se aproxima do observado por Guiñazú *et al.*, 2007 onde as células utilizadas foram derivadas do baço, retiradas de camundongos controle (não estimulados com Cz) e infectadas por 36h pela

cepa Talahuen do *T. cruzi*. Como resultado, houve um aumento na contagem de amastigotas em relação aos grupos estimulados com Cz. Com uma quantidade de 35 amastigotas em 100 células em 36h, nossos achados nos mostram uma quantidade maior de amastigotas, aproximadamente 65 em 100 células no tempo de 48h. Esta elevação provavelmente é influenciada pelo tempo de cultivo e pela cepa. Este perfil também foi descrito no trabalho de Kloetzel *et al.*, 1984, no qual 3h horas após a infecção de macrófagos peritoneais pela cepa Y do *T. cruzi* já foram observadas 32 amastigotas, sendo que este número aumenta após 48h da infecção, chegando a 40 amastigotas.

Para determinar este efeito causado pelas citocinas, realizamos análises de correlação nos grupos infectados entre a: quantidade de células infectadas e de amastigotas em relação as citocinas TNF e IL-10. Não observamos significância nos dados analisados. Neste sentido esperávamos que houvesse uma correlação negativa de TNF e a quantidade de células infectadas/amastigota, de modo que quanto maior as concentrações de TNF menor seria a quantidade de células infectadas/amastigotas e uma correlação positiva para IL-10, ou seja, quanto maior as concentrações de IL-10 maior seria a quantidade de células infectada/amastigotas. Este perfil foi observado nos trabalhos de Cunha-Neto e colaboradores 1998, utilizando células T de pacientes com cardiopatia chagásica crônica onde houve a replicação do *T. cruzi in vitro*, demonstraram que a presença do *T. cruzi* estava correlacionada a níveis aumentados de IFN, TNF e IL-12 e que reduzia a produção de IL-2 e IL-10, uma vez que a resposta inflamatória neste momento é predominante, em consequência haveria uma redução dos mediadores regulatórios.

7. CONCLUSÃO

Os nossos resultados, sugerem que a porcentagem de células infectadas pelo *T. cruzi* está associada à produção de mediadores inflamatórios e de NO. Os mediadores inflamatórios (TNF, IL-17, CCL2), a citocina regulatória (IL-10), assim como o NO foram produzidos em ambos os grupos analisados na presença do antígeno de *T. cruzi* ou do parasito vivo. Este perfil também foi observado quando utilizamos a IL-33 como estímulo em combinação com o parasito.

A IL-33 mostrou-se capaz de atuar tanto durante a produção de citocinas/quimiocina de perfil Th1(inflamatórias), assim como na produção da citocina regulatória de perfil Th2. Isso nos indica que ela pode atuar em ambos aspectos em uma resposta imune e que tem uma participação importante no início de uma infecção.

Dessa forma, concluímos que a citocina IL-33 participa na produção de mediadores inflamatórios e regulatórios durante a infecção e estímulos *in vitro* pelo *Trypanosoma cruzi* em cultura de células J774.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; TROTTA, E.; SIMEONOV, D.R.; MARSON, A.; BLUESTONE, J.A. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. **Science immunology**, v. 3, n. 25, jul.2018.

ABSTON, E. D.; BARIN, J. G.; CIHAKOVA, D.; BUCEK, A.; CORONADO, M. J.; BRANDT, J. E.; BEDJA, D.; KIM, J.B.; GEORGAKOPOULOS, D.; GABRIELSON, K. L.; MITZNER, W.; FAIRWEATHER, DE. L. IL-33 independently induces eosinophilic pericarditis and cardiac dilation: ST2 improves cardiac function. **Circulation: Heart Failure**, v.5, n.3, p.366-375, mar.2012.

ABDULKHALEQ, L. A.; ASSI, M. A.; ABDULLAH, R.; ZAMRI-SAAD, M.; TAUFIQ-YAP, Y. H.; HEZMEE, M. N. M.; The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary world**, v.11, n.5, p.627, may.2018.

ABRAHAMSOHN, I. A. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 117-121, jan.1998.

ACEVEDO, G. R.; GIRARD, M. C.; GOMEZ, K. The unsolved jigsaw puzzle of the immune response in Chagas disease. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1929, aug.2018.

ALDINUCCI, D.; COLOMBATTI, A. The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression. **Mediators of inflammation**, v. 2014, p.1-12, jan.2014.

ALVES-FILHO, J.C. *et al.* Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nature medicine**, v. 16, n. 6, p. 708, jun.2010.

AMARANTE-MENDES, G. P.; ADJEMIAN, S.; BRANCO, L. M.; ZANETTI, L. C.; WEINLICH, R.; BORTOLUCI, K. R. Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. **Frontiers in immunology**, v. 9, oct.2018.

AMATO, N; CAMPOS, R.; HIGAKI, Y. Análise clínica e baseada em exames subsidiários de paciente da qual foi isolada, há vinte e três anos, a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.16, n.4, p. 238-244, 1974.

AOKI, R *et al.* Mast cells play a key role in host defense against herpes simplex virus infection through TNF- α and IL-6 production. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 9, p. 2170-2179, may.2013.

BABA, T.; MUKAIDA, N. Role of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α /CCL3 in leukemogenesis. **Molecular & cellular oncology**, v. 1, n. 1, p. 1-16, jul,2014.

BABIC, Z. M.; ZUNIC, F. Z.; PANTIC, J. M.; RADOSAVLJEVIC, G. D., JOVANOVIC, I. P.; ARSENIJEVIC, N. N.; LUKIC, M. L. IL-33 receptor (ST2) deficiency downregulates myeloid precursors, inflammatory NK and dendritic cells in early phase of sepsis. **Journal of biomedical science**, v. 25, n. 1, p. 56, jul.2018.

BAEKKEVOLD, E. S.; ROUSSIGNE, M.; YAMANKA, T.; JOHANSEN, F. E.; JAHNSEN, F. L.; AMALRIC, F.; BRANDTZAE, P.; ERARD, M.; HARALDSEN, G.; GIRARD, J.P. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *The American Journal of Pathology*, v.163, n.1, 69–79, jul.2003.

BANNWART, C. F.; NAKAIRA, E.T.; SARTORI, A.; PERAÇOLI, M.T.S. Interleukin-15: its role in microbial infections. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. 562-575, 2007.

BERGER, Abi. Th1 and Th2 responses: what are they?. **Bmj**, v. 321, n. 7258, p. 424, aug.2000.

BENT, R.; MOLL, L.; GRABBE, S.; BROS, S. Interleukin-1 Beta—A Friend or Foe in Malignancies?. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 8, p. 2155, jul.2018.

BESNARD, A. G.; GUABIRABA, R.; NIEDBALA, W.; PALOMO, J.; REVERCHON, F.; SHAW, T. N.; COUPER, K.N.; RYFFEL, B.; LIEW, F. Y. IL-33-mediated protection against experimental cerebral malaria is linked to induction of type 2 innate lymphoid cells, M2 macrophages and regulatory T cells. **PLoS pathogens**, v.11, n.2, p.1-21, feb.2015.

BHAVSAR, I.; MILLER, C.S.; AL-SABBAGH, M. Macrophage inflammatory protein-1 Alpha (MIP-1 alpha)/CCL3: as a biomarker. **General Methods in Biomarker Research and their Applications**, p. 1-22, jun. 2014.

BLOM, L.; POULSEN, L. K. IL-1 family members IL-18 and IL-33 upregulate the inflammatory potential of differentiated human Th1 and Th2 cultures. **The Journal of Immunology**, v.189, n.9, p.4331-4337, nov.2012.

BOONSTRA, A.; RAJSBAUM, M.; MARQUES, R.; ASSELIN-PATUREL, C.; PEREIRA, J.P.; BATES, E.E.; AKIRA, S.; VIEIRA, P.; LIU, Y.J.; TRINCHIERI, G.; O'GARRA, A. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. **The Journal of Immunology**, v.177, n.11, p.7551-8, dec.2006.

BOSCARDIN, S. B.; TORRENCILHAS, A. C. T.; MNARIN, R.; REVELLI, S.; REY, E. G.; TONELLI, R. R.; SILBER, A. M. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 14, n. 6, p. 1373-1384, jul.2010.

BRADLEY, JR. TNF-mediated inflammatory disease. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v.214, n.2, p.149-160, jan.2008.

BRENER, Z. Laboratory-acquired Chagas disease: comment. **Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, n.81, v.3, p. 527, 1987.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro, **Guanabara-Koogan Press**, ed.2,v.1, p. 48-74, 2000.

BROTAS, A. M.; CUNHA, J. M. T.; LAGO, E. H. J.; MACHADO, C. C. N.; CARNEIRO, S. C. D. S. Tumor necrosis factor-alpha and the cytokine network in psoriasis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v.87, n.5, p.673-683, sep-oct.2012.

BUSTAMANTE, J.M.; BIXBY, L.M.; TARLETON, R.L. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. **Nature Medicine**, v.14, n.5, p.542-50, may.2008.

CARDILLO, F.; DE PINHO, R. T.; ANTAS, P. R. Z.; MENGEL, J. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Pathogens and Disease**, v.73, n.9, p.1-8, dec.2015.

CARRIERE, V.; ROUSSEL, L.; ORTEGA, N.; LACORRE, D.A.; AMERICH, L.; AGUILAR, L.; BOUCHE, G.; GIRARD, J.P. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. v.104, n.1, p.282–7, jan.2007.

CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L.V.; FERNANDES, J. F. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. **The Journal of protozoology**, v.14, n.3, p.447-451, aug.1967.

CAYROL, C.; GIRARD, J. P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. **Immunological reviews**, v.281, n.1, p.154-168, jan.2017.

CAYROL, C.; GIRARD, J.P. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.106, n.22, p.9021–9026, jun.2009.

CHACKERIAN, A.A.; OLDHAM, E.R.; MURPHY, E.E.; SCHMITZ, J.; PFLANZ, S.; KASTELEIN, R.A. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. **The Journal of Immunology**, v.179, n.4, p. 2551-2555, aug.2007.

CHADBAN, S. J.; TESCH, G. H.; FOTI, R.; LAN, H. Y.; ATKINS, R. C.; NIKOLIC-PATERSON, D. J. Interleukin-10 differentially modulates MHC class II expression by mesangial cells and macrophages in vitro and in vivo. **Immunology**, v.94, n.1, p.72, may.1998.

CHAGAS, Carlos. Nova Tripanozomíase Humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi*. n. gen., n. SP. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n.1, p.159-218, aug.1909.

CHANG, T-T.; CHEN, J-W. Emerging role of chemokine CC motif ligand 4 related mechanisms in diabetes mellitus and cardiovascular disease: friends or foes?. **Cardiovascular diabetology**, v. 15, n. 1, p. 117, aug.2016.

CHAPLIN, David D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. 3-23, feb.2010.

CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, X.; ZHAO, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v.9, n.6, p.7204-7218, dec.2018.

CHENG, N. L.; CHEN, X.; KIM, J.; SHI, A. H.; NGUYEN, C.; WERSTO, R.; WENG, N. P. (2015). MicroRNA-125b modulates inflammatory chemokine CCL4 expression in immune cells and its reduction causes CCL4 increase with age. **Aging cell**, v. 14, n. 2, p. 200-208, apr.2015.

CHEN, S.; CHEN, B.; WEN, Z.; HUANG, Z.; YE, L. IL-33/ST2-mediated inflammation in macrophages is directly abrogated by IL-10 during rheumatoid arthritis. **Oncotarget**, v. 8, n. 20, p. 32407, mar.2017.

CHOI, Y. S.; CHOI, H. J.; MIN, J. K.; PYUN, B. J.; MAENG, Y. S.; PARK, H.; KIM, J.; KIM, Y.M.; KWON, Y. G. Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 114, n. 14, p. 3117-3126, oct. 2009.

CHU, Wen-Ming. Tumor necrosis factor. **Cancer letters**, v.328, n.2, p.222-225, jan.2013.

CHAN, B. C.; LAM, C. W.; TAM, L. S.; WONG, C. K. Roles in allergic inflammation and therapeutic perspectives. **Frontiers in immunology**, v. 10, mar.2019.

COCCIA, E. M.; SEVERA, M.; GIACOMINI, E.; MONNERON, D.; REMOLI, M.E.; JULKUNEN, I.; CELLA, M.; LANDE, R.; UZÉ, G. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. **European Journal of Immunology**, v.34, n.3, p.796-805, mar.2004.

COHEN, E.S.; SCOTT, I.C.; MAJITHIYA, J.B, *et al.* Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation. **Nature Communications**, v.6, n.8327, p.1-10, sep.2015.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v.115, n.1-2, p.5-13, 2010.

CRUVINEL, W. D. M.; MESQUITA, J. D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. D.; SILVA, N. P. D.; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v.50, n.4, p.434-461,2010.

CUA, D. J.; TATO, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v.10, n.7, p.479, jul.2010.

CUNHA-NETO, E. *et al.* Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 133-137, 1998.

CUTRULLIS, R.A.; PETRAY, P.B.; CORRAL, R.S. MIF-driven activation of macrophages induces killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* dependent on endogenous production of tumor necrosis factor, nitric oxide and reactive oxygen species. **Immunobiology**, v.222, n.2, p.423–31, feb.2017.

DA MATTA GUEDES, P. M.; GUTIERREZ, F. R.; MAIA, F. L.; MILANEZI, C. M.; SILVA, G. K.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 2, feb.2010.

DE PABLOS, L.M.; OSUNA, A. Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. **Infection and Immunity**, v.80, n.7, p. 2258-4, jul.2012.

DESHMANE, S. L.; KRMELEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B. E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of interferon & cytokine research**, v.29, n.6, p.313-326, jun.2009.

DE WAAL MALEFYT, R.; HAANEN, J. B. A. G.; SPITS, H.; RONCAROLO, M. G.; TE VELDE, A.; FIGDOR, C.; JOHNSON, K.; KASTELEIN, R.; YSSEL, H.; DE VRIES, J. E. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **Journal of Experimental Medicine**, v.174, n.4, p.915-924, oct.1991.

DIAS, João Carlos Pinto. Doença de Chagas, ambiente, participação e Estado. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, n.17, p.165-169, 2001.

DIAS, J.; SCHOFIELD, C. J. The evolution of Chagas Disease control after 90 years since Carlos Chagas Discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n.94, v.1, p.103-121. sep.1999.

DINARELLO, Charles.A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity, **Immunology Reviews**, v.281, n.1, p.8-27, jan. 2018.

DOS SANTOS, F. C.; LISBOA, C. V.; XAVIER, S. C.; DARIO, M. A.; VERDE, R. D. S.; CALOURO, A. M.; ROQUE, A.L.R.; JANSEN, A. M. (2018). *Trypanosoma sp.* diversity in Amazonian bats (Chiroptera; Mammalia) from Acre state, Brazil. **Parasitology**, v.145, n.6, p.828-837, may.2018.

DUDAKOV, J.A.; HANASH, A.M.; VAN DEN BRINK, M.R.M. Interleukin-22: immunobiology and pathology, **Annual review of immunology**, v. 33, p. 747-785, mar.2015.

EMING, S. A.; HAMMERSCHMIDT, M.; KRIEG, T.; ROERS, A. Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, v.20, n.5, p. 517-527, apr.2009.

ESPOSITO, E.; CUZZOCRE, S. Anti-TNF therapy in the injured spinal cord. **Trends in pharmacological sciences**, v.32, n.2, p.107-115, feb.2011.

FELIZARDO, A. A.; CALDAS, I.S.; MENDONÇA, A.A.S.; GONÇALVES, R.V.; TANA, F.L.; ALMEIDA, L.A.; NOVAES, R.D. Impact of *Trypanosoma cruzi* infection on nitric oxide synthase and arginase expression and activity in young and elderly mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 129, p. 227-236, 2018.

FERREIRA, V. L.; BORBA, H. H. L.; BONETTI, A. D. F.; LEONART, L.; PONTAROLOP, R. Cytokines and interferons: types and functions. In Autoantibodies and Cytokines. **IntechOpen**, mar. 2018. Disponível em:<https://www.intechopen.com/books/autoantibodies-and-cytokines/cytokines-and-interferons-types-and-functions>. Acesso em: 22 de jul de 2019.

FIorentino, D. F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; MOORE, K. W.; O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **The Journal of Immunology**, v.146, n.10, p.3444-3451, may.1991.

FOSTER, JR. The functions of cytokines and their uses in toxicology. **International journal of experimental pathology**, v.82, n.3, p.171-192, jun.2001.

GADANI, S. P.; CRONK, J.C.; NORRIS, G.T.; KIPNIS, J. IL-4 in the brain: a cytokine to remember. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 9, p. 4213-4219, nov.2012.

GAFFEN, Sarah L. An overview of IL-17 function and signaling. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 402-407, sep. 2008.

GARBERS, C.; HEINK, S.; KORN, T.; ROSE-JOHN, S. Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.17, n.6, p.395-412. may.2018.

GOMES, J. A. S.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; ROCHA, M.O.C.; MARTINS-FILHO, O. A.; GAZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and immunity**, v. 71, n. 3, p. 1185-1193, mar.2003.

GOMES, Juliana Assis Silva *et al.* Inflammatory mediators from monocytes down-regulate cellular proliferation and enhance cytokines production in patients with polar clinical forms of Chagas disease. **Human immunology**, v. 75, n. 1, p. 20-28, jan. 2014.

GONTIJO, E.D.; SANTOS, S.E. Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas, 2009. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=173>>. Acesso em: 20/08/2019.

GORBACHEV, Anton V. *et al.* CXC chemokine ligand 9/monokine induced by IFN- γ production by tumor cells is critical for T cell-mediated suppression of cutaneous tumors. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 4, p. 2278-2286, feb.2007.

GRACE, T. D. C. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. **Nature**, v.195, p.788-789, aug. 1962.

GUIÑAZÚ, N.; PELLEGRINI, A.; CARRERA-SILVA, E. A.; AOKI, M. P.; CABANILLAS, A. M.; GÍRONÉS, N.; FRESNO, M.; CANO, R.; GEA, S. Immunisation

with a major *Trypanosoma cruzi* antigen promotes pro-inflammatory cytokines, nitric oxide production and increases TLR2 expression. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 11, p. 1243-1254, mar.2007.

GULATI, K.; GUHATHAKURTA, S.; JOSHI, J.; RAI, N.; RAY, A. Cytokines and their role in health and disease: a brief overview. **MOJ Immunol**, v. 4, n. 2, p. 00121, oct.2016.

GUTIERREZ, F.R.S.; MINEO, T.W.P.; PAVANELLI, W.R.; GUEDES, P.M.M.; SILVA, J.S. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 236-245, jul.2009.

HAYAKAWA, H.; HAYAKAWA, M.; TOMINAGA, S.I. Soluble ST2 suppresses the effect of interleukin-33 on lung type 2 innate lymphoid cells. **Biochemistry Biophysics Reports**, v.5, p.401–7, mar.2016.

HEADLAND, S.E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, v.27, n.3, p. 149-160, mar.2015.

HUMPHREYS, N. E.; XU, D.; HEPWORTH, M. R.; LIEW, F. Y.; GRENCIS, R. K.; IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. **The Journal of Immunology**. v.180, n.4, p.2443–2449, feb.2008.

HUNG, L. Y.; LEWKOWICH, I.P.; DAWSON, L.A.; DOWNEY, J.; YANG, Y.; SMITH, D. E.; HEBERT, D.R.; IL-33 drives biphasic IL-13 production for noncanonical Type 2 immunity against hookworms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA v.110, n.1, p.282–287 ,jan.2013.

HUNTER, C. A.; ELLIS-NEYES, L. A.; SLIFER, T.; KANALY, S.; GRUNING, G., FORT, M., RENICK, D.; ARAUJO, F. G. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 7, p. 3311-3316, apr.1997.

JONES; L.A.; ROBERTS, F.; NICKDEL, M.B.; BROMBACHER, F.; MCKENZIE, A.N.; HENRIQUEZ, F.L.; ALEXANDER, J.; ROBERTS, C.W. IL-33 receptor (T1/ST2) signalling is necessary to prevent the development of encephalitis in mice infected with *Toxoplasma gondii*. **European Journal of Immunology**, v.40, n.2, p.426-436, feb.2010.

JOSEPHSON, K.; LOGSDON, N. J.; WALTER, M. R. Crystal structure of the IL-10/IL-10R1 complex reveals a shared receptor binding site. **Immunity**, v.15, n.1, p.35-46, jul.2001.

JUNIOR, P. A. S.; MOLINA, I.; MURTA, S. M. F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; SALVADOR, F.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, C. M. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: a review. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.97, n.5, p.1289-1303, nov.2017.

JUNTILA, Ilkka S. Tuning the cytokine responses: an update on interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 888, jun.2018.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature immunology**, v. 11, n. 5, p. 373, apr.2010.

KIM, L.K.; MORITA, R.; KOBAYASHI, Y.; EISENBARTH, S.C.; LEE, C.G.; ELIAS, J.; EYNON, E.E.; FLAVEL, R.A. AMCase is a crucial regulator of type 2 immune responses to inhaled house dust mites. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.112, n.22, jun.2015

KIM, Y.H.; YANG, T.Y.; PARK, C.S.; AHN, S.H.; SON, B.K.; KIM, J.H.; LIM, D.H.; JANG, T.Y. Anti-IL-33 antibody has a therapeutic effect in a murine model of allergic rhinitis. **Allergy**. v.67, n.2, p.183-190, feb.2012.

KIM, Y.K.; SHIN, JS.; NAHM, M.H. NOD-like receptors in infection, immunity, and diseases. **Yonsei medical journal**, v. 57, n. 1, p. 5-14, jan.2016.

KLOETZEL, J.K.; MILDER, R. V.; UMEZAWA, E. S. *Trypanosoma cruzi* interaction with macrophages: differences between tissue culture and bloodstream forms. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 26, n. 4, p. 179-185, aug.1984.

KOMAI-KOMA, M.; WANG, E.; KUROWSKA-STOLARSKA, M.; LI, D.; MCSHARRY, C.; & Xu, D. Interleukin-33 promoting Th1 lymphocyte differentiation depends on IL-12. **Immunobiology**, v.221,n.3, p.412-417, mar.2016.

KONG, D. H.; KIM, Y.; KIM, M.; JANG, J.; LEE, S. Emerging roles of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in immunological disorders and cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 4, p. 1057, apr.2018.

KOURO, T.; TAKATSU, K. IL-5-and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. **International immunology**, v. 21, n. 12, p. 1303-1309, dec.2009.
KRAFTS, Kristine P. Tissue repair: The hidden drama. **Organogenesis**, v. 6, n. 4, p. 225-233, dec.2010.

KROPF, S. P.; AZEVEDO, N.; FERREIRA, L.O. Doença de Chagas: a construção de um fato científico e de um problema de saúde pública no Brasil. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232000000200009 > Acesso em: 23 de agos de 2019.

KUCHLER, A.M.; POLHEIMER, J.; BALOGH, J.; SPONHEIM, J.; MANLEY, L.; SORENSEN, D.R.; DE ANGELIS, P.M.; SCOTT, H.; HARALDSEN G. Nuclear interleukin-33 is generally expressed in resting endothelium but rapidly lost upon angiogenic or proinflammatory activation. **The American Journal of Pathology**. v.173, n.4, p.1229–1242, oct.2008.

KUMAR, A.; ABBAS, W.; HERBEIN, G. TNF and TNF receptor superfamily members in HIV infection: new cellular targets for therapy? **Mediators of inflammation**, dec.2013.

KUROWSKA-STOLARSKA, M.; *et al.* IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. **The Journal of Immunology**, v.183, n.10, p.6469-6477, oct.2009.

LEAVEY, J.K.; TARLETON, R.L. Cutting edge: dysfunctional CD8⁺ T cells reside in nonlymphoid tissues during chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, v.170,n.5,p.2264-2248, mar.2003.

LEE, H.Y.; RHEE, C.K.; KANG, J.Y.; BYUN, J.H.; CHOI, J.Y.; KIM, S.J.; KIM, Y.K.; KWON, S.S.; LEE, S.Y. Blockade of IL-33/ST2 ameliorates airway inflammation in a murine model of allergic asthma. **Experimental Lung Research**, v.40, n.2, p.66-76, jan.2014.

LEI, Y.; BOINAPALLY, V.; ZOLTOWSKA, A.; ADNER, M.; HELLMAN, L.; NILSSON, G. Vaccination against IL-33 inhibits airway hyperresponsiveness and inflammation in a house dust mite model of asthma. **Plos One**, v.10, n.7, p.01-15, jul.2015.

LI, C.; MAILLET, I.; MACKOWIAK, C.; VIALA, C.; DI PADOVA, F.; LI, M.; TOGBE, D.; QUESNIAUX, V.; LAI, Y.; RYFFEL, B. Experimental atopic dermatitis depends on IL-33R signaling via MyD88 in dendritic cells. **Cell Death & Disease**, v.8, n.4, p.01-11, apr.2017.

LI, L.; ZHU, H.; ZUO, X. Interleukin-33 in systemic sclerosis: expression and pathogenesis. **Frontiers in immunology**, v.9,p.01-07, nov.2018.

LI, R.; YANG, G.; YANG, R.; PENG, X.; LI, J. Interleukin-33 and receptor ST2 as indicators in patients with asthma: a meta-analysis. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 9, p. 14935, sep,2015.

LI, R.; YANG, G.; YANG, R.; PENG, X.; LI, J. Interleukin-33 and receptor ST2 as indicators in patients with asthma: a meta-analysis. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 9, p. 14935, sep,2015.

LI, S.; ZHU, F. X.; ZHAO, X. J.; AN, Y. Z. The immunoprotective activity of interleukin-33 in mouse model of cecal ligation and puncture-induced sepsis. **Immunology letters**, v. 169, p. 1-7, jan.2016.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. (2000). Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v.127, n.2, p.117-126, feb.2000.

LIU, X.; LI, M.; WU, Y.; ZHOU, Y.; ZENG, L.; HUANG, T. Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.386, n.1, p.181-185, aug.2009.

LO, H. M.; LAI, T. H.; LI, C. H.; WU, W. B. TNF- α induces CXCL1 chemokine expression and release in human vascular endothelial cells in vitro via two distinct signaling pathways. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.35, n.3, 339. mar.2014.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v.193, n.1, p.265-275, nov.1951.

LUZINA, I.G.; KEEGAN, A.D.; HELLER, N.M.; ROOK, G.A.W.; SHEA-DONOHUE, T.; ATAMAS, S.P. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives”. **Journal of leukocyte biology**, v. 92, n. 4, p. 753-764, 2012.

LV, D.; ZHANG, Y.; KIM, H-J.; ZHANG, L.; MA, X. CCL5 as a potential immunotherapeutic target in triple-negative breast cancer. **Cellular & molecular immunology**, v. 10, n. 4, p. 303-310, feb.2013.

LV, R.; ZHAO, J.; LEI, M.; XIAO, D.; YU, Y.; XIE, J. IL-33 attenuates sepsis by inhibiting IL-17 receptor signaling through upregulation of SOCS3. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1961-1972, aug.2017.

MADOURI F, *et al.* Caspase-1 activation by NLRP3 inflammasome dampens IL-33-dependent house dust mite-induced allergic lung inflammation. **Journal of Molecular Cell Biology**, v.7, n.4, p.351–365. aug.2015.

MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-Neto, E.; MACIEL, B.C.; SIMÕES, M.V.; Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v.115, n.9, p.1109-1123, mar.2007.

MARTIN, D. L.; WEATHERLY, D. B.; LAUCELLA, S. A.; CABINIAN, M. A.; CRIM, M. T.; SULLIVAN, S.; HEIGES, M.; CRAVEN, H.S.; ROSERBENG, C.S.; COLLINS, H.,N.; SETTE, A.; POSTAN, M.; TARLETON, L.,R. CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. **PLoS pathogens**, v.2, n.8, p. 0731-0740, aug.2006.

MAZZA, S.; FREIRE, R. S. Manifestaciones cutâneas de inoculacion, metastáticas y hematógenas em enfermedad de Chagas. Chagomas de inoculación, chagomas metastáticos y chagomas hematógenos. **Public MEPR**. n.46, p.3–38. 1940.

MACCAURO, Giulio *et al.* Induction of CCL2 (MCP-1) by IL-33 in human umbelical cord blood mast cells. **European Journal of Inflammation**, v. 10, n. 2, p. 217-226, may.2012.

MCEVER, Rodger P. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. **Cardiovascular research**, v. 107, n. 3, p. 331-339, may. 2015.

MCNAB, F.; MAYER-BARBER, K.; SHER, A.; WACK, A.; O'GARRA, A. Type I interferons in infectious disease. **Nature Reviews Immunology**, v.15, n.2, p.87-103, feb.2015.

MEDEIROS, N. I.; PINTO, B. F.; ELOI-SANTOS, S. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MAGALHAES, L.; DUTRA, W. O.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GOMES, J. A. Evidences of different IL-1 β activation pathways in innate immune cells from

indeterminate and cardiac patients with chronic Chagas disease. **Frontiers in immunology**, v.10, n.800, p.01-11, apr.2019.

MÉLIK-PARSADANIANTZ, S.; ROSTÉNE, W. Chemokines and neuromodulation. **Journal of neuroimmunology**, v.198, n.1-2, p.62-68. jul.2008.

MITCHELL, P. D *et al.* IL-33 and its receptor ST2 after inhaled allergen challenge in allergic asthmatics. **International archives of allergy and immunology**, v. 176, n. 2, p. 133-142, apr.2018.

MILLER, A. M. Role of IL-33 in inflammation and disease, **Journal of Inflammation**, v. 8, n.1, p.1-12, aug.2011.

MILLER, A. M.; LIEW, F. Y. The IL-33/ST2 pathway—a new therapeutic target in cardiovascular disease. **Pharmacology & therapeutics**, v.131, n.2, p.179-186, aug.2011.

MILLER, A.M.; XU, D.; ASQUITH, D.L.; DENBY, L.; LI, Y.; SATTAR, N.; BAKER, A.H.; MCINNES, I.B.; LIEW, F.Y. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v.205, n.2, p.339-346. feb.2008

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas, o que é, causas, sintomas, tratamento e prevenção, 2019. Acesso em 29/08/2019 <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas>

MONACO, C.; NANCHAHAL, J.; TAYLOR, P.; FELDMANN, M. Anti-TNF therapy: past, present and future. **International immunology**, v.27, n.1, p.55-62, jan.2015.

MONASTERO, R, N.; PENTYALA, S. Cytokines as biomarkers and their respective clinical cutoff levels. **International journal of inflammation**, v. 2017, ,apr.2017.

MONIN, L.; GAFFEN, S. L. Interleukin 17 family cytokines: signaling mechanisms, biological activities, and therapeutic implications. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v.10, n.4, p.02-24, apr.2018.

MOORLAG, S. J. C. F. *et al.* The role of the interleukin-1 family in trained immunity. **Immunology Reviews**, v. 281, n. 1, p. 28-39, jan. 2018.

MOULIN, D.; DONZÉ, O.; TALABOT-AYER, D.; MÉZIN, F.; PALMER, G.; GABAY, C. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. **Cytokine**, v. 40, n. 3, p. 216-225, sep.2007.

MOUSSION, C.; ORTEGA, N.; GIRARD, J.P. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells *in vivo*: a novel 'alarmin'? **PLoS one**, v.3, n.10, p.01-08, oct.2008.

MUÑOZ-FERNANDEZ, M.A.; FERNANDEZ, M.A.; FRESNO, M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF- α and IFN- γ through a nitric oxide-dependent mechanism. **Immunology Letters**,v.33, n.1, p.35-40, jun.1992.

NASCIMENTO, Amanda Vasconcelos do *et al.* Avaliação das quimiocinas e da expressão de seus receptores em células mononucleares de pacientes portadores da doença de Chagas submetidas à infecção *in vitro* com *Trypanosoma cruzi* e tratamento com benznidazol. **Tese de Doutorado**. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. mar.2015.

NASEEM, S.; IQBAL, R.; MUNIR, T. Role of interleukin-6 in immunity: A Review. **International Journal of life Sciences Research**, v.4, n.2, p.268-274, apr. 2016.

NETEA, M. G.; SIMON, A.; DE VEERDONK, F.V.; KULLBERG, B.J.; VAND DER MEER, J.W.M.; JOOSTEN, L.A.B. IL-1 β processing in host defense: beyond the inflammasomes. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 2, feb.2010.

NELSON, Brad H. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 7, p. 3983-3988, apr. 2004.

NORMATON, M.; MARTI, L. C. Dados recentes em IL-17 e células Th17, e implicações na doença do enxerto contra hospedeiro. **Einstein**, v.11, n.2, apr.2013.

OLIVEIRA, D. M.; SILVA-TEIXEIRA, D. N.; ARAUJO-FILHO, R.; GOES, A. M. Antigenic stimulation is more efficient than LPS in inducing nitric oxide production by human mononuclear cells on the in vitro granuloma reaction in schistosomiasis. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 32, n. 11, p. 1437-1445, nov.1999.

ONDA, H.; KASUYA, H.; TAKAKURA, K.; HORI, T.; IMAIZUMI, T.; TAKEUCHI, T.; INOUE, I.; TAKEDA, J. Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. **Journal Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.19, n.11, p.1279–1288, nov.1999.

PALMER, G.; LIPSKY, B.P.; SMITHGALL, M.D.; MEININGER, D.; SIU, S.; TALABOT-AYER, D.; GABAY, C. SMITH, D.E.The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP, enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33. **Cytokine**, v.42, n.3, p.358-364, jun.2008.

PAIVA, C. N.; FIGUEIREDO, R. T.; KROLL-PALHARES, K.; SILVA, A. A.; SILVÉRIO, J. C.; GIBALDI, D.; PYRRO ADOS, S.; BENJAMIM, C.F.; LANNES-VIEIRA, J.; BOZZA, M. T. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of leukocyte biology**, v.86, n.5, p.1239-1246, nov.2009.

PALOMINO, D.C.T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein**, v. 13, n. 3, p. 469-473, sep.2015.

PENG, G.; MU, Z.; CUI, L.; LIU, P.; WANG, Y.; WU, W.; HAN, X. Anti-IL-33 Antibody Has a Therapeutic Effect in an Atopic Dermatitis Murine Model Induced by 2, 4- Dinitrochlorobenzene. **Inflammation**, v.41, n.1 p.154-163, feb.2018.

PEREIRA, P. C. M.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 19, n.34, p. 1-17, dec.2013.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M.N.; KELLY, J.M.; WILKINSON, S.R.; RADI, R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. **Biochemical Journal**, v.410, n.2, p.359-368, mar.2008.

PODOLNIKOVA, N. P.; KUSHCHAYEVA, Y. S.; WU, Y.; FAUST, J.; UGAROVA, T. P. The role of integrins α M β 2 (Mac-1, CD11b/CD18) and α D β 2 (CD11d/CD18) in macrophage fusion. **The American journal of pathology**, v. 186, n. 8, p. 2105-2116, aug.2016.

PONCINI, C. V.; SOTO, C. D. A.; BATALLA, E.; SOLANA, M. E.; CAPPAS, S. M. G. *Trypanosoma cruzi* induces regulatory dendritic cells in vitro. **Infection and immunity**, v. 76, n. 6, p. 2633-2641, 2008.

PRATA, A. Evolution of the clinical and epidemiological knowledge about Chagas disease 90 years after its discovery. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, n.1, p.81-88, sept.1999.

RAMAMSAWMI, Rajendranath *et al.* The monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism is associated with cardiomyopathy in human Chagas disease. **Clinical infectious diseases**, v. 43, n. 3, p. 305-311, aug.2006.

RAMOS, T.N.; BULLARD, D.C.; BARNUM, S. R. ICAM-1: isoforms and phenotypes. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 10, p. 4469-4474, may.2014.

RANK, M. A.; KOBAYASHI, T.; KOZAKI, H.; BARTEMES, K. R.; SQUILLACE, D. L.; KITA, H. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.123, n.5, p.1047-1054, may.2009.

RASSI, Jr. A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v.375, n.9723, p.1388-1402, apr.2010.

REZENDE-OLIVEIRA, K.; SARMENTO, R.R.; RODRIGUES JUNIOR, V. Production of cytokine and chemokines by human mononuclear cells and whole blood cells after infection with *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 45-50, feb.2012.

ROBINSON, T. O.; SCHLUNS, K. S. The potential and promise of IL-15 in immunoncogenic therapies. **Immunology letters**, v. 190, p. 159-168, aug.2017.

ROITT, B. M. *Imunologia*, ed.5^a, São Paulo, **Manole**. p.123-124, 1999.

ROFFÊ, E.; ROTHFUCHS, A. G.; SANTIAGO, H. C.; MARINO, A. P. M.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; ECKHAUS, M.; ANTONELLI, L.R.V.; MURPHY, P. M. L-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 2, p. 649-660, dec.2012.

ROMAÑA, C. Acerca de um sintoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de La enfermedad de Chagas. La conjuntiviti sés quizotripanósica unilateral. (Hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de La enfermedad). **Public MEPRA**. n.22, p.16–28, 1935.

ROSALES, C.; URIBE-QUEROL, E. Phagocytosis: a fundamental process in immunity. **BioMed research international**, v. 2017, jun.2017.

ROTHFUCHS, A.G.; TRUMSTEDT, C.; WIGZELL, H.; ROTTENBERG, M.E. Intracellular bacterial infection-induced IFN- γ is critically but not solely dependent on toll-Like receptor 4-myeloid differentiation factor 88-IFN- $\alpha\beta$ -STAT1 signaling. **The Journal of Immunology**, v.172, n.10, p.6345-6353, may.2004.

ROTTENBERG, E.M; ORN, A. Chagas' Disease. *Encyclopedia of Immunology*, 2.ed **Academic Press**, p- 521-526, 1998.

ROUFOSSE, Florence. Targeting the interleukin-5 pathway for treatment of eosinophilic conditions other than asthma. **Frontiers in medicine**, v. 5, p. 49, apr.2018.

ROUSSEL, L.; ERARD, M.; CAYROL, C.; GIRARD, J.P. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. **EMBO Reports**, v.9, n.10, p.1006–1012, oct.2008.

SAEED, S.; REVELL, P. A. Production and distribution of interleukin 15 and its receptors (IL-15R α and IL-R2 β) in the implant interface tissues obtained during revision of failed total joint replacement. **International journal of experimental pathology**, v. 82, n. 3, p. 201-209, jun.2001.

SAKASHITA, M.; *et al.* Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. **Clinical & Experimental Allergy**, v.38, n.12, p.1875-1881, dec.2008.

SCALFONE, L. K.; NEL, H. J.; GAGLIARDO, L. F.; CAMERON, J. L.; AL-SHOKRI, S.; LEIFER, C. A.; FALLON, P.G.; APPLETON, J. A. Participation of MyD88 and interleukin-33 as innate drivers of Th2 immunity to *Trichinella spiralis*. **Infection and immunity**, v.81, n.4, p.1354-1363, apr.2013.

SCHMITZ, J.; *et al.* IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v.23, n.5, p.479-490, nov.2005.

SCHNOOR, M.; ALCAIDEI, P.; VOISIN, M. B.; VAN-BUUL, J. D. Crossing the vascular wall: common and unique mechanisms exploited by different leukocyte subsets during extravasation. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p.1-24, oct.2015.

SCHMUNIS, G.A. 2007. Epidemiology of CD in non endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.1, p.75–85, oct.2007.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P.J.; RAVASI, T.; HUME, D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**. v.75, n.2, p.163–189, feb.2004.

SEDGER, L. M.; MCDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: from mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants—past, present and future. **Cytokine & growth factor reviews**, v.25, n.4, p.453-472, aug.2014.

SEKI, K.; SANADA, S.; KUDINOVA, A. Y.; STEINHAUSER, M. L.; HANDA, V.; GANNON, J.; LEE, R. T. Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. **Circulation: Heart Failure**, v.2, n.6, p.684-691, nov.2009.

SEYFIZADEH, N.; SEYFIZADEH, N.; GHARIBI, T.; BABALOO, Z. Interleukin-13 as an important cytokine: a review on its roles in some human diseases. **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, v. 62, n. 4, p. 341-378, jun.2015.

SILVERPIL, E.; GLADER, P.; HANSSON, M.; LINDÉN, A. Impact of Interleukin-17 on Macrophage Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils and Particles. **Inflammation**, v.34, n.1, p.1–9, feb.2010.

SHIMIZU, M.; *et al.* Functional SNPs in the distal promoter of the ST2 gene are associated with atopic dermatitis. **Human molecular genetics**, v.4, n.19, p.2919-2927, oct.2005.

SHYAMAPADA, M. Epidemiological Aspects of Chagas Disease—a Review. **Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies**, v.2, n.2, p.01-07, may.2014.

SHEN, J. X.; LIU, J.; ZHANG, G. J. Interleukin-33 in malignancies: friends or foes? **Frontiers in immunology**, v.9, n.3051, p.01-07, dec.2018.

SIGMA ALDRICH. Removal of Adherent Cells from a Culture Surface Using Trypsin. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/protocols/biology/removal-of-adherent-cells.html>. Acesso em: 25 de julho de 2019.

SILVA, J. S.; MORRISSEY, P.J.; GRABSTEIN, K.H.; MOHLER, K.M.; ANDERSON, D.; REED, S.G. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 175, n. 1, p. 169-174, jan.1992.

SILVA, J.S.; VESPA, G.N.; CARDOSO, M.A.; ALIBERTI, J.C.; CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected γ -interferon-activated macrophages. **Infection and Immunity**, v.63, n.12, p. 4862–4867, dec.1995.

SINVAGALA, R.; SUMANLATHA, G. Cytokines that mediate and regulate immune responses. **Innovative Immunology**, p.1-26, apr.2015.

SMITHGALL, M. D.; COMEAU, M. R.; YOON, B. R.; KAUFMAN, D.; ARMITAGE, R.; SMITH, D. E. IL-33 amplifies both Th1-and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. **International immunology**, v.20, n.8, 1019-1030, aug.2008.

STAVESKY, R. J.; BYUN, D. K., GEORGER, M. A.; ZAFFUTO, B. J.; GOODMAN, A.; BECKER, M. W.; CALVI, L.M.; FRISCH, B. J. The Chemokine CCL3 Regulates Myeloid Differentiation and Hematopoietic Stem Cell Numbers. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 14691, oct.2018.

STEMPIN, C.; GIORDANENGO, L.; GEA, S.; CERBÁN, F. Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. **Journal of leukocyte biology**, v.72, n.4, p.727-734, oct.2002.

SUN, L.; HE, C.; NAIR, L.; YEUNG, J.; EGWUAGU, C. E. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. **Cytokine**, v. 75, n. 2, p. 249-255, oct.2015.

TADOKORO, C. E.; 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- γ production after stimulation with *Trypanosoma cruzi* antigens. **Immunology letters**, v.77, n.1, p.31-38, may.2001.

TAKATSU, Kiyoshi. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 87, n. 8, p. 463-485, oct.2011.

TALVANI, A.; ROCHA, M. O.; BARCELOS, L. S.; GOMES, Y. M.; RIBEIRO, A. L.; TEIXEIRA, M. M. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor— α in chagasic cardiomyopathy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 7, p. 943-950, apr.2004.

TALVANI, A.; TEIXEIRA, M. M. Inflammation and Chagas disease: some mechanisms and relevance. **In Advances in parasitology**, v.76, p. 171-194, Academic Press, 2011.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 6, n. 10, oct.2014.

TEIXEIRA, A. R.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.5, p.463-491, aug.2006.

TEIXEIRA, A. R. L.; NITZ, N.; GUIMARO, M. C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C. A. Chagas disease. **Postgraduate Medical Journal**, v.82, n.974, p.788-798, dec.2006.

TEIXEIRA, M.M.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends in Parasitology**. v.18, n.6, p. 262-265, jun.2002.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International Journal for Parasitology** v.28, n.1, p.85-104, jan.1998.

TOKUNAGA, Ryuma *et al.* CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation—a target for novel cancer therapy. **Cancer treatment reviews**, v. 63, p. 40-47, nov.2018.

TRACEY, K. J.; CERAMI, D. A. Tumor necrosis factor: A pleiotropic cytokine and therapeutic target. **Annual review of medicine**, v.45, n.1, p.491-503, 1994.

TRINCHIERI, Giorgio. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 133, feb.2003.

VAINER, N.; DEHLENDORFF, C.; JOHANSEN, J.S. Systematic literature review of IL-6 as a biomarker or treatment target in patients with gastric, bile duct, pancreatic and colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 51, p. 29820-29841, jul.2018.

VIGNALI, D.A.A.; KUCHROO, V.K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. **Nature immunology**, v. 13, n. 8, p. 722, aug. 2012.

VESPA, G. N.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 11, pp. 5177–5182, nov.1994.

VESTWEBER, Dietmar. How leukocytes cross the vascular endothelium. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 11, p. 692-704, oct.2015.

WALDMANN, Thomas A. The biology of IL-15: implications for cancer therapy and the treatment of autoimmune disorders. In: **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v.16, n.1, p. S28-S30, dec.2013.

WALLACE, C. A.; MOIR, J.; MALONE, D.F.G.; DUNCAN, D.; DEVARAJAN, G.; CRANE, I.J. Regulation of T-lymphocyte CCL3 and CCL4 production by retinal pigment epithelial cells. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 54, n. 1, p. 722-730, jan.2013

WALLING, B. L.; KIM, M. LFA-1 in T cell migration and differentiation. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 952, may.2018.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION, Media centre, Chagas disease (American trypanosomiasis). Factsheet, n.340, 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/news->

room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)>. Acesso em: 22 de agos, 2019.

WU, H.; HYMOWITZ, S. G. Structure and function of tumor necrosis factor (TNF) at the cell surface. **In Handbook of cell signaling**. 2. ed. Academic Press. p. 265-275, 2010.

YAMAUCHI, L. M.; ALIBERTI, J. C.; BARUFFI, M. D., PORTELA, R. W.; ROSSI, M. A.; GAZZINELLI, R. T.; MINEO, J.R.; SILVA, J. S. The binding of CCL2 to the surface of *Trypanosoma cruzi* induces chemo-attraction and morphogenesis. **Microbes and Infection**, v.9, n.1, p.111–118, oct. 2007.

YANG, Q.; *et al.* IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8+ T cells. **European journal of immunology**, v.41, n.11, 3351-3360, oct.2011.

YASUDA, K. *et al.* Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v.109, n.9, p.3451–3456, feb.2012.

YOSHIMURA, T. The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: a foe or ally?. **Cellular & molecular immunology**, v.15, n.4, p.335-345, jan.2018.

YOUNG, H. A. Regulation of interferon- γ gene expression. **Journal of interferon & cytokine research**, v.16, n.8, p.563-568, aug.1996.

ZAMORANO, J.; RIVAS, M. D.; PEREZ, G. M. Interleukin-4: A multifunctional cytokine. **Immunologia**, v. 22, n.2, p. 215-24, apr-jun.2003.

ZENEWICZ, Lauren. A. There is a gap in our knowledge. **Immuno Horizons**, v.2, n.6, p.198-207, jul.2018.

ZELANTE, T.; FRIC, J.; WONG, A.Y.W.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Interleukin-2 production by dendritic cells and its immuno-regulatory functions. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 161, jun.2012.

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. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.7, p.1051-1054, nov.2009.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de Chagas? **Revista da Biologia**, p.44-48, jul.2011.

ZHANG, JM.; AN, J. Cytokines, inflammation and pain. **International anesthesiology clinics**, v. 45, n. 2, p. 27, nov.2007.

ZHANG, Hai-Feng *et al.* IL-33 promotes IL-10 production in macrophages: a role for IL-33 in macrophage foam cell formation. **Experimental & molecular medicine**, v. 49, n. 11, p. 388-388, nov.2017.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation and pain. **International anesthesiology clinics**, v.45, n.2, p.27-37. nov.2007.

